

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**ÉVALUATION DE L'EFFET DU DÉLAI DANS LE TRAITEMENT DE  
L'HÉMORRAGIE INTRACÉRÉBRALE AVEC LA DEXAMÉTHASONE  
UTILISANT UN MODÈLE D'INJECTION STÉRÉOTAXIQUE DE  
COLLAGÉNASE CHEZ LE RAT**

Par

Claudine Savard, DVM, DÉS

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option pathologie

Août 2007

© Claudine Savard, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

ÉVALUATION DE L'EFFET DU DÉLAI DANS LE TRAITEMENT DE  
L'HÉMORRAGIE INTRACÉRÉBRALE AVEC LA DEXAMÉTHASONE  
UTILISANT UN MODÈLE D'INJECTION STÉRÉOTAXIQUE DE  
COLLAGÉNASE CHEZ LE RAT

Présenté par

Claudine Savard, DVM, DÉS

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

.....

Monique Doré, présidente-rapporteuse

.....

Pierre Hélie, directeur de recherche

.....

Pascal Vachon, codirecteur

.....

Joane Parent, membre du jury

## **RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS**

Des études précédentes avec un modèle d'hémorragie intracérébrale induite par injection de collagénase dans le caudoputamen chez le rat ont démontré que la dexaméthasone (DM) est bénéfique dans le traitement de l'hémorragie intracérébrale lorsque administrée avant ou rapidement après l'induction de la lésion. Reprenant ce modèle, nous avons évalué l'effet du délai dans le traitement à la DM. Les groupes traités ont reçu une première dose de DM 2 heures, 4 heures ou 6 heures suite à l'induction de la lésion et une deuxième dose 24 heures plus tard. Un groupe n'a reçu aucun traitement (contrôle positif). La fonction neuromotrice des animaux a été évaluée avant (24 h) et après (24 et 48 h) l'injection intracérébrale. À 48 h post-injection, ils ont été euthanasiés, puis perfusés et les cerveaux ont été prélevés pour évaluation histopathologique et immunohistochimique pour la protéine glio-fibrillaire acide (GFAP). Le groupe des animaux traités 2 h après l'injection de collagénase a obtenu des résultats significativement supérieurs à tous les autres lors de son évaluation neurologique à 24 et 48 h. Le volume de l'hématome a été significativement réduit et le nombre de neutrophiles présents à la périphérie de la lésion était diminué chez tous les groupes ayant reçu la DM. Le nombre de neurones nécrotiques dans la pénombre n'a pas diminué de façon significative chez aucun groupe d'animaux traités. Les astrocytes présents en périphérie de la lésion hémorragique présentaient des évidences d'hypertrophie marquée. En conclusion, la dexaméthasone a des effets bénéfiques dans le traitement de l'hémorragie intracérébrale lorsque administrée dans les 6 heures suivant l'induction de l'hémorragie; les fonctions neurologiques sont significativement moins diminuées lorsque la DM est administrée dans les 2 premières heures suivant l'induction de l'hémorragie.

Mots clés : hémorragie intracérébrale/ dexaméthasone/ glucocorticoïde/ neutrophiles/  
astrocytes/ évaluation neurologique/ cerveau

## **SUMMARY AND KEYWORDS**

Previous studies have shown that, in a rat model of collagenase-induced intracerebral hemorrhage in the caudoputamen, dexamethasone (DM) is beneficial in the treatment of intracerebral hemorrhage when administered before or shortly after induction of the lesion. Using the same model, we have evaluated the effect of delay in the DM treatment. Treated groups received a first dose of dexamethasone 2 hours, 4 hours or 6 hours following lesion induction and a second dose 24 hours later. One group did not receive any treatment (positive control). Neuromotor functions were evaluated before (24 h) and after (24 and 48 h) the intracerebral collagenase injection. After the last neurological evaluation, animals were deeply anesthetized and the brain was removed following perfusion for histopathology and GFAP immunohistochemistry. Animals treated 2 h after collagenase injection had significantly better results than all other groups at their neurological evaluation at 24 and 48 hours. Hematoma volume was significantly reduced and the number of neutrophils at the periphery of the lesion was also reduced in all treated groups, but not between treated groups. The number of necrotic neurons in the penumbra did not show any significant reduction in any treatment group. Astrocytes present at the periphery of the hematoma showed marked hypertrophy. In conclusion, dexamethasone is beneficial in the treatment of intracerebral hemorrhage when administered in the first 6 hours following the induction of the hemorrhage, but neurological functions are significantly less altered when dexamethasone is administered within the first 2 hours following the induction of the hemorrhage.

Keywords: intracerebral hemorrhage/ hematoma/ dexamethasone/ rat/ collagenase/ glucocorticoid/ neutrophils/ astrocytes/



## TABLE DES MATIÈRES

<b>PAGE DE TITRE .....</b>	<b>i</b>
<b>PADE D'IDENTIFICATION DU JURY .....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS FRANÇAIS .....</b>	<b>iii</b>
<b>RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS ANGLAIS .....</b>	<b>vii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>DÉDICACE .....</b>	<b>xx</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>xxii</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>RECENSION DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>3</b>
<b>1. HÉMORRAGIES CÉRÉBRALES CHEZ LES ANIMAUX .....</b>	<b>4</b>
<b>2. MODÈLES D'HÉMORRAGIE CÉRÉBRALE .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Modèles avec impact .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Modèles d'accélération inertielle .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Modèles par déformation directe .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Modèles par injection .....</b>	<b>8</b>
<b>3. LOCALISATION DE LA LÉSION .....</b>	<b>10</b>
<b>4. CARACTÉRISTIQUES HISTOPATHOLOGIQUES .....</b>	<b>11</b>
<b>4.1 Dommages primaires et secondaires .....</b>	<b>11</b>

4.2 Pathophysiologie du dommage initial.....	12
4.3 Apoptose et nécrose cellulaire .....	13
4.4 Facteur alpha de nécrose tumorale et interleukines .....	14
4.5 Glutamate.....	15
4.6 Astrocytes .....	17
4.7 Neutrophiles.....	18
4.8 Erythrocytes.....	19
5. CHRONOLOGIE DU DOMMAGE.....	20
6. CHANGEMENTS COMPORTEMENTAUX .....	21
7. APPROCHES THÉRAPEUTIQUES .....	23
7.1 Inhibiteurs de l'apoptose.....	23
7.2 Agents anti-oxydants .....	24
7.3 Inhibiteurs des récepteurs NMDA .....	25
7.4 Inhibiteurs calciques .....	26
7.5 Cyclosporine .....	26
7.6 Facteurs de croissance .....	27
7.7 Corticostéroïdes .....	27
8. OBJECTIF .....	29
MÉTHODOLOGIE.....	30
ARTICLE.....	30
PAGE PRESENTATION .....	31

ABSTRACT.....	32
INTRODUCTION .....	33
MATERIALS AND METHODS .....	34
Animals.....	34
Experimental design .....	35
Surgical procedures.....	35
Behavioral evaluations.....	36
Perfusion, histological procedures, immunohistochemistry and image analysis.....	36
Statistical analysis.....	37
RESULTS .....	38
Behavioral and rotarod treadmill evaluations.....	38
Histopathological evaluation .....	39
DISCUSSION .....	41
REFERENCES .....	45
LEGEND TO FIGURES .....	48
FIGURES.....	50
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS.....</b>	<b>53</b>
<b>1.INTRODUCTION .....</b>	<b>54</b>
<b>2.ÉVALUATION FONCTIONNELLE.....</b>	<b>54</b>
<b>3.ÉVALUATION HISTOPATHOLOGIQUE ET</b>	
<b>IMMUNOHISTOCHIMIQUE.....</b>	<b>56</b>

<b>CONCLUSION .....</b>	<b>58</b>
<b>SOURCES DOCUMENTAIRES .....</b>	<b>60</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>69</b>
ANNEXE I: Répartition des animaux par groupe.....	70
ANNEXE II: Photographies matériel et méthodes.....	71
ANNEXE III: Tables de résultats.....	73
ANNEXE IV: Microphotographies des paramètres évalués.....	77

## **LISTE DES TABLEAUX**

**ANNEXE I**

<b>Tableau I : Répartition des animaux par groupe.....</b>	<b>69</b>
--	-----------

**ANNEXE III**

<b>Tableau II : Performances sur Rotarod des animaux 24h post-op.....</b>	<b>72</b>
---	-----------

<b>Tableau III : Performances sur Rotarod des animaux 48h post-op.....</b>	<b>72</b>
--	-----------

<b>Tableau IV : Performances à l'examen neurologique des animaux 24h post-op.....</b>	<b>73</b>
---	-----------

<b>Tableau V : Performances à l'examen neurologique des animaux 48h post-op.....</b>	<b>73</b>
--	-----------

<b>Tableau VI : Nombre de neurones nécrotiques par animal par groupe.....</b>	<b>74</b>
---	-----------

<b>Tableau VII : Nombre de neutrophiles par animal par groupe.....</b>	<b>74</b>
--	-----------

<b>Tableau VIII : Volume de l'hématome intracérébral par animal par groupe.....</b>	<b>75</b>
---	-----------

## **LISTE DES FIGURES**



## RECENSION DE LA LITTÉRATURE

<b>Figure 1.</b> Localisation stéréotaxique du noyau caudoputamen chez le rat .....	11
---	----

## ARTICLE

<b>Figure 1.</b> Histogram representation of mean neurological scores .....	50
<b>Figure 2.</b> Histogram representation of mean rotarod scores .....	50
<b>Figure 3.</b> Histogram representation of mean intracerebral hematoma volume .....	51
<b>Figure 4.</b> Histogram representation of mean neutrophils counts .....	51
<b>Figure 5.</b> Histogram representation of mean necrotic neurons counts .....	52

## ANNEXE II

<b>Figure 1.</b> Photographie du matériel utilisé lors de la chirurgie .....	70
<b>Figure 2.</b> Photographie de la technique chirurgicale .....	71

## ANNEXE IV

<b>Figure 1.</b> Microphotographie à 20X de l'évaluation des neutrophiles .....	76
<b>Figure 2.</b> Microphotographie à 20X de l'évaluation des neurones nécrotiques .....	77
<b>Figure 3.</b> Photographie au stéréomicroscope de l'hémorragie intracérébrale .....	78
<b>Figure 4.</b> Microphotographie à 20X de l'évaluation des astrocytes réactifs .....	79



## **LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS**

ATPase	adénosine triphosphatase
AVC	accident vasculaire cérébral
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CNS	central nervous system
CA	Californie
Ca	Canada
Cl	chlore
cm <sup>3</sup>	centimètre cubique
DM	dexaméthasone
FGF	fibrin growth factor
g	gramme
GABA	acide gamma amine butyrique
GC	glucocorticoïde
GFAP	glial fibrillary acidic protein
h	heure
IGF-1	insuline-like growth factor-1
H&E	hématoxyline et éosine
IP	intrapéritonéal
IV	intraveineux
K	potassium
kg	kilogramme
L	litre
Mg	magnésium
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre

mm <sup>3</sup>	millimètre cubique
MP	méthylprednisolone
n	nombre
Na	sodium
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
ON	Ontario
PARG	poly(ADP-ribose) glycohydrolase
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
QC	Québec
SD	déviation standard
SNC	système nerveux central
USA	United States of America
vs	versus
X	facteur de grossissement
μL	microlitre
μm	micromètre

## **DÉDICACE**

*À ma mère, pour croire en moi souvent plus que moi-même et pour son support inconditionnel.*

*À mes amies, Cécile et Isabelle, parce qu'elles sont les meilleures pour faire oublier les longues périodes de doutes.*

## **REMERCIEMENTS**

*Par sa passion et son dévouement pour la recherche, pour la médecine vétérinaire et pour l'enseignement, le Dr Pascal Vachon a été une inspiration et un pilier pour moi tout au long de ce travail. Je lui suis entièrement reconnaissante pour m'avoir montré les multiples visages de la recherche, avec ses embûches et ses exploits, et m'avoir malgré tout donné le goût pour elle.*

*Merci beaucoup au Dr Pierre Hélié pour ses conseils et ses réflexions qui m'auront à tout coup fait voir mes travaux sous un œil différent.*



## **INTRODUCTION**

Le cerveau est constitué de différents types cellulaires inter-reliés entre eux de façon à permettre à l'être humain et aux animaux d'effectuer des actions mécaniques et cognitives des plus complexes. Malgré leur immense potentiel, ces cellules sont néanmoins fortement dépendantes de l'homéostasie du milieu et sont très vulnérables à tout événement susceptible de provoquer un déséquilibre tant au niveau énergétique, oxydatif ou acido-basique. Par conséquent, un étroit équilibre doit impérativement être maintenu. Afin de protéger le cerveau, il existe diverses structures anatomiques macroscopiques, telles que la boîte crânienne et les méninges, et microscopiques, comme la barrière hémato-méningée et les astrocytes.

Lorsque des événements nocifs surviennent, tels que les traumatismes crâniens, une approche thérapeutique rapide et ciblée est nécessaire afin de préserver le maximum de capacité cérébrale. Une bonne compréhension de la pathophysiologie de ces événements et des différents mécanismes de protection est nécessaire afin d'établir l'approche thérapeutique à adopter.

## **RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

## **1. HÉMORRAGIES INTRACÉRÉBRALES CHEZ LES ANIMAUX**

Les hémorragies intracérébrales seules ou, le plus souvent, accompagnant d'autres lésions sont des causes de mort et d'incapacité en médecine vétérinaire et humaine (Kumar V, Chap 28, 2005; McGavin 2007 Chap 14). En médecine vétérinaire, les hémorragies intracérébrales sont le plus souvent causées par des chutes ou des accidents de voiture (McGavin MD, 2007 Chap 14). Avec l'avènement de l'imagerie par résonance magnétique en médecine vétérinaire, il a été démontré que les animaux peuvent également souffrir d'accidents vasculaires cérébraux. Ces accidents vasculaires cérébraux peuvent être causés par de l'hypertension systémique primaire ou secondaire, des malformations vasculaires cérébrales, des septicémies, des coagulopathies et des néoplasmes (Platt SR, 2003).

## **2. MODÈLES D'HÉMORRAGIE CÉRÉBRALE**

Différents modèles animaux ont été mis de l'avant afin d'étudier les hémorragies intracérébrales. Ces modèles permettent d'évaluer différents facteurs directs et indirects influençant le développement et l'évolution des lésions cérébrales tels que la réaction inflammatoire et la compression du parenchyme par l'épanchement sanguin ou l'œdème. De plus, ces modèles permettent l'évaluation de la réponse du tissu cérébral à différents traitements. Les modèles doivent être représentatifs de situations cliniques et offrir une bonne reproductibilité.

Parmi les principaux modèles d'hémorragies cérébrales utilisés en recherche humaine et vétérinaire, les modèles d'accélération avec impact,

d'accélération inertielle, de déformation cérébrale directe, par injection de sang ou de collagénase sont les plus connus (Finnie JW, 2002; Laurer HL, 1999).

## **2.1 Modèles avec impact**

Différentes techniques avec impact ont été élaborées. L'objectif est de provoquer une déformation de la boîte crânienne sous l'effet d'un choc mécanique. L'impact peut être causé à l'aide d'un pistolet percuteur, d'un pendule ou par la chute d'un poids sur le crâne (Shapira Y, 1988). Le choc cause fréquemment une fracture du crâne (Laurer HL, 1999). La déformation du crâne amène une déformation du parenchyme sous-jacent et provoque des dommages directs aux vaisseaux sanguins et au neuroparenchyme. Ces modèles tentent de simuler les présentations cliniques courantes, comme les accidents de voiture ou les chutes. Les principales lésions observées sont des contusions, des hémorragies sous-arachnoïdiennes et un dommage axonal diffus. Lorsqu'elles sont situées dans les leptoméniges, les hémorragies causées sont généralement superficielles (Tornheim PA, 1983). Leurs effets sur le parenchyme sont indirects, principalement via la compression qu'elles engendrent. Par contre, lors de situations cliniques, de nombreux patients présentent des lésions profondément enfouies dans le parenchyme (McGavin MD, 2007). Aussi, certains paramètres de l'hémorragie, comme le volume de l'hématome et son emplacement, ne peuvent être évalués précisément dû à leur distribution multifocale. Donc, la technique permet une appréciation qualitative du phénomène, mais peu de mesures objectives peuvent en être extraites. De plus, la déformation confère des lésions d'étendue et

de distribution variables d'un animal à l'autre et qui sont généralement très extensives ou diffuses (Foda MA, 1994). Ces modèles ont été utilisés chez plusieurs espèces dont le rat, le lapin, le chat, le mouton et les primates. Également, la force nécessaire pour provoquer la déformation du crâne chez le rat est fréquemment fatale (Finnie JW, 2002). Donc, les modèles d'hémorragie cérébrale avec impact, malgré qu'ils soient plus représentatifs des situations cliniques, sont peu reproductibles et, par conséquent, ont une utilisation limitée.

## **2.2 Modèles d'accélération inertielle**

Pour la réalisation du modèle d'accélération inertielle, le corps de l'animal est maintenu fixe sur une charpente qui lui fera subir une accélération importante puis une décélération rapide. La tête de l'animal peut être fixée à la charpente ou laissée libre. Le cerveau, étant légèrement mobile dans la boîte crânienne, va entrer en collision avec la surface interne du crâne lors de la décélération. Lorsque la tête est laissée libre, celle-ci effectue un mouvement de fouet lors de la décélération, amplifiant ainsi le choc du cerveau contre le crâne. L'accélération peut être linéaire (translation) ou angulaire (rotation). Ce modèle simule efficacement l'impact subi chez l'humain par le cerveau lors d'accidents de voiture. Par contre, ce modèle est très peu représentatif des situations menant à l'hémorragie cérébrale chez les animaux. Il s'agit donc d'un modèle plus approprié à l'humain (Gennarelli TA, 1983). Aussi, comme dans le modèle avec impact, le dommage causé est diffus et donc n'affecte pas une région bien circonscrite du cerveau. L'hémorragie et le dommage neuronal sont principalement retrouvés en superficie (hémorragies sous-

durales). Seul le modèle par accélération angulaire cause un dommage axonal diffus dans la matière blanche sous-corticale. Ce modèle a été utilisé de façon plus extensive chez les primates et chez le porc. Il a également été réalisé occasionnellement chez d'autres espèces, comme le chat (Nelson LR, 1979; Ross DT, 1994). Cette technique est très peu pratiquée chez les animaux de plus petite taille. Bien que chez les espèces gyrencéphales le modèle soit efficace et offre une bonne reproductibilité, chez les espèces lissencéphales il en est tout autre. Chez ces dernières, une importante résistance du parenchyme cérébral aux forces d'accélération et de décélération a été notée, n'amenant généralement que des dommages mineurs et variables (Finnie JW, 2002).

### **2.3 Modèles par déformation directe**

Le modèle par déformation directe consiste à altérer le parenchyme cérébral par une compression appliquée directement sur les méninges ou le cortex à travers une ouverture de la boîte crânienne (craniotomie). La déformation est produite à l'aide d'un piston mécanique ou d'une pulsation de fluides (Lighthall JW, 1989). Cette technique produit des dommages plus localisés et il est plus facile de déterminer l'emplacement exact de la lésion. Une pulsation de fluides appliquée sur la ligne médiane du cerveau (faux du cerveau) provoque des lésions par compression au niveau du tronc cérébral, sans impact majeur sur le cortex et la région sous-corticale. Une pulsation effectuée plus latéralement pourra affecter l'hippocampe ou la matière blanche sous-corticale d'un hémisphère cérébral, tout en épargnant le tronc cérébral et l'hémisphère contralatéral (Graham DI, 2000).

Certains de ces sites lésionnels sont fréquemment affectés lors de traumatismes crâniens présentés en médecine humaine et vétérinaire. Cette technique offre une bonne reproductibilité et elle a été utilisée principalement chez le rat, le chat et le furet (Whiting MD, 2006; Lau A, 2006; Lebesgue D, 2006). Bien que les hémorragies et le dommage rencontrés avec cette technique soient plus localisés qu'avec les modèles précédents (Finnie JW, 2002), sa difficulté technique (reproductibilité de la force à appliquer ainsi que de l'angle adéquat pour affecter le noyau désiré) rend ce modèle moins intéressant techniquement pour la présente étude.

#### **2.4 Modèles par injection**

Différents modèles d'hémorragie cérébrale par injection ont été réalisés au cours des 15 dernières années. Dans ces modèles, l'animal ne subit aucun impact ou déformation directe du parenchyme cérébral. Ces techniques ne recréent pas le dommage traumatique du neuroparenchyme, mais les composantes hémorragiques et inflammatoires survenant suite à la rupture de vaisseaux sanguins. Donc, elles ne reflètent pas la situation la plus souvent rencontrée en médecine vétérinaire, mais permettent d'étudier la problématique de l'hémorragie lors de trauma cérébral et les traitements pour celles-ci. Il existe deux principales variantes, soit par injection de sang ou de collagénase. L'approche est similaire dans les deux cas. L'animal est placé dans un appareil stéréotaxique et reçoit une injection de collagénase bactérienne ou de sang par un trou de craniotomie. Des atlas stéréotaxiques permettent d'atteindre une région anatomique précise du cerveau et les injections se font habituellement dans les noyaux sous-corticaux. L'hématome ainsi produit est



très localisé. Ces modèles ont été établis chez le rat. L'animal récupère rapidement de la chirurgie et, dépendamment du site de la lésion, peut présenter des signes cliniques nous permettant d'évaluer l'évolution de la lésion par des examens neurologiques (Chesney JA, 1995; Rosenberg GA, 1990).

Lors d'un trauma crânien, la rupture des vaisseaux sanguins peut être mécanique (rupture directement reliée à l'impact) ou chimique. Dans cette dernière, la rupture des vaisseaux découle du relâchement de nombreuses cytokines et enzymes protéolytiques suite à l'activation de la réponse inflammatoire. La collagénase est une enzyme protéolytique qui est présente dans sa forme inactive dans, entre autres, les macrophages et les neutrophiles (Kumar V, 2005 Chap 2). Lors de la réaction inflammatoire, ces cellules activent leur collagénase qu'elles libèrent dans le milieu environnant. Le collagène de type IV est un des principaux constituants des membranes basales, incluant celles des vaisseaux sanguins. La collagénase dégrade la membrane basale des vaisseaux sanguins environnant ce qui affaiblit leur paroi, permet la fuite du sang dans le neuropile et entraîne une réaction inflammatoire qui perpétue les lésions (Mun-Bryce S, 1998). La réaction inflammatoire entraîne le relâchement d'enzymes et de cytokines pro-inflammatoires par les neutrophiles et est responsable du développement de l'hémorragie cérébrale (Mun-Bryce S, 1998). Le modèle d'hémorragie cérébrale par injection de collagénase reprend donc les événements propagateurs de l'hémorragie traumatique. Il permet l'analyse des différentes étapes de développement de l'hémorragie et de ses conséquences sur le parenchyme environnant. Les changements histopathologiques retrouvés chez ces animaux sont

grandement similaires à ceux présents lors de situations cliniques et le modèle est reproductible (Rosenberg GA, 1990).

Avec le modèle par injection de sang, l'accumulation locale de sang ainsi produite devait reproduire les conséquences d'un épanchement hémorragique. Par contre, ce modèle ne cause qu'un hématome amenant une compression du parenchyme adjacent et une légère réaction inflammatoire locale (Nath FP, 1987). Donc, bien que très reproductible, ce modèle ne représente pas correctement la pathophysiologie de l'hémorragie cérébrale traumatique.

### **3. LOCALISATION DE LA LÉSION**

En utilisant les modèles d'hémorragie intracérébrale par déformation directe ou par injection, il est possible de créer une hémorragie à un endroit précis du neuroparenchyme (Finnie JW, 2002). Les noyaux de la base du cerveau sont impliqués dans le mouvement volontaire, et certaines fonctions cognitives et comportementales complexes. Ils reçoivent des signaux provenant du cortex cérébral, du thalamus et du tronc cérébral, et en renvoient au tronc cérébral et au cortex cérébral, notamment via le thalamus. Les composantes des noyaux gris de la base sont principalement le striatum (composé des noyaux caudé, putamen et striatum ventral) et le pallidum (avec ses segments internes et externes), et finalement la substance noire (avec ses portions réticulée et compacte) et les noyaux subthalamiques (Kandel ER, 2000). Chez le rat, les noyaux caudé et putamen forment une structure unique, appelé le noyau caudoputamen. Ce noyau est de grande taille et donc facilement localisable avec un appareil stéréotaxique

(Paxinos G, 1998). De plus, lorsque ce noyau est lésé, l'animal exprime des signes cliniques facilement visualisables tels qu'un déficit d'initiation du mouvement, une raideur musculaire et des tremblements (Jolicoeur FB, 1992).

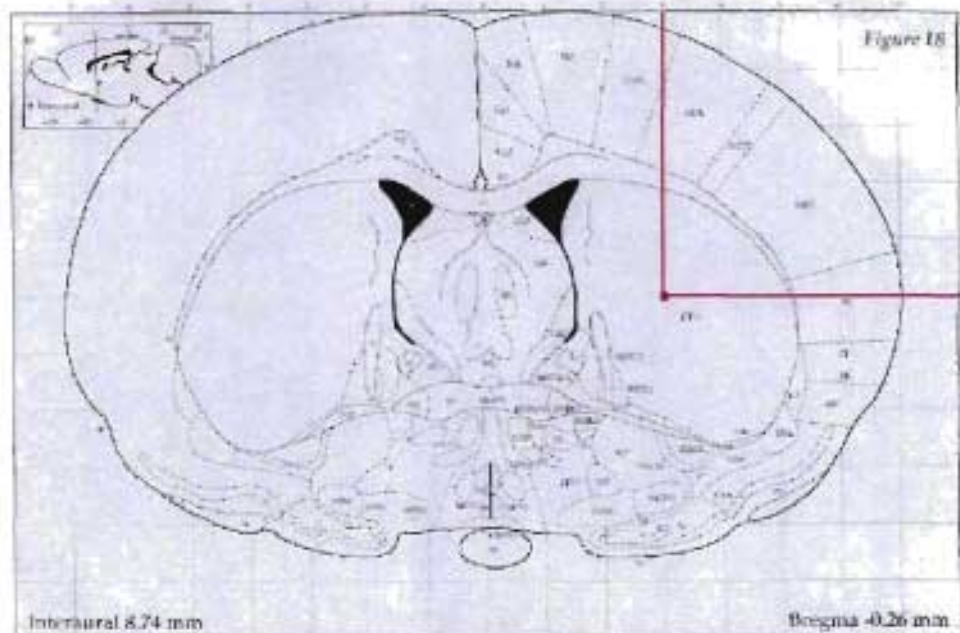


Figure 1. Localisation stéréotaxique du noyau caudoputamen chez le rat (Paxinos G, 1988)

#### 4. CARACTÉRISTIQUES HISTOPATHOLOGIQUES

##### 4.1 Dommages primaires et secondaires

Dans la plupart des traumatismes crâniens sévères, les dommages cérébraux seront de deux ordres : les dommages primaires et secondaires (Finnie JW, 2002). La force de l'impact cause les dommages directs (ou primaires) aux vaisseaux sanguins et au neuroparenchyme. Ces dommages sont le résultat de la déformation du parenchyme et de la force de cisaillement qui en résulte sur les différentes structures. Les dommages primaires sont réfractaires aux traitements. Les

dommages secondaires sont une complication des dommages primaires. L'hypoxie, l'ischémie, l'œdème, l'augmentation de pression intracrânienne et les infections sont des exemples de dommages secondaires aux lésions vasculaires. Ces complications répondent à certains traitements et elles sont, par conséquent, au coeur des recherches actuelles dans l'élaboration de traitement de l'hémorragie cérébrale (Finnie JW, 2002).

#### **4.2 Pathophysiologie du dommage initial**

L'atteinte des vaisseaux sanguins lors de trauma peut prendre différentes formes telles que la rupture totale ou partielle du vaisseau, ou même uniquement des dommages sommaires à l'endothélium. Les conséquences cliniques de ce phénomène peuvent apparaître plusieurs heures ou jours après le dommage initial, comme par exemple lors de l'augmentation de la pression intracrânienne. La rupture totale ou partielle d'un vaisseau sanguin cause un bris dans la barrière hémato-méningée. Par ce bris, les protéines plasmatiques quittent la circulation sanguine pour s'infiltrer dans le neuroparenchyme et entraînent un œdème cérébral sous l'effet de la pression oncotique. Même des dommages subtils à l'endothélium vasculaire peuvent être significatifs; les radicaux libres en seraient les principaux médiateurs (Hall ED, 1989; Peeling J, 1998). Suite à un stimulus, comme ici un dommage à l'endothélium vasculaire, la phospholipase C s'active et transforme les phospholipides formant la membrane plasmique des cellules, en acide arachidonique, pour amener ultimement à une augmentation des produits de la cyclooxygénase tels que la prostaglandine G<sub>2</sub>. Pour se faire, l'enzyme

prostaglandine synthétase (ou cyclooxygénase) s'active et transforme l'acide arachidonique en prostaglandines. Cette prostaglandine synthétase entraîne la production d'un radical superoxide lors de son activation. De plus, l'oxydation des catécholamines et de l'hémoglobine extravasculaire, l'infiltration neutrophilique et l'oxyde nitrique sont autant de sources de radicaux libres (Hatton J, 2001). Le radical superoxide s'attaquerait à la microcirculation cérébrale, agirait en élément aggravateur et provoquerait la rupture de la barrière hémato-méningée (Hall ED, 1989). Il causerait ces dommages en amenant une peroxydation lipidique, une protéolyse, une raréfaction de l'ADP et une fragmentation de l'ADN des cellules. La réaction de peroxydation initiée par les radicaux libres est catalysée par le fer libre relâché par l'hémoglobine, la transferrine et la ferritine dans les tissus où le pH et le niveau d'oxygène sont suboptimaux (Hatton J, 2001).

#### **4.3 Apoptose et nécrose cellulaire**

Suite à un dommage traumatique, différents phénomènes peuvent survenir dans le neuroparenchyme. Parmi ceux-ci, notons l'apoptose et la nécrose cellulaire (Lau A, 2006). L'apoptose consiste en une mort cellulaire programmée, dont l'exécution est principalement gérée par des enzymes intrinsèques à la cellule (caspases). Cette forme de mort cellulaire se caractérise par une condensation cellulaire et nucléaire suivie d'une fragmentation de la cellule qui sera éventuellement éliminée par les cellules phagocytaires ou parenchymateuses environnantes. Les mécanismes menant à l'apoptose sont dépendants de l'énergie disponible dans le milieu. La nécrose, quant à elle fait suite à un dommage

physique ou ischémique. Elle est caractérisée par une tuméfaction cellulaire avec un bris de la membrane cellulaire et la lyse de la chromatine nucléaire. Cette lyse cellulaire amène le relâchement dans le milieu environnant de nombreux déchets cellulaires, enzymes et cytokines qui stimulent la réaction inflammatoire. Cette forme de mort cellulaire survient entre autres lorsque la cellule est en déficit énergétique (Hatton J, 2001; Kumar V, 2005 Chap 1; McGavin MD, 2007 Chap 1; Slauson DO, 2001).

#### **4.4 Facteur alpha de nécrose tumorale et interleukines**

Le facteur alpha de nécrose tumorale (TNF $\alpha$ ) et les interleukines 1 $\beta$  et 6 (IL-1 $\beta$  et IL-6) sont les principales cytokines impliquées dans l'activation de la réaction inflammatoire, de même que le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Hatton J, 2001). Ces cytokines sont, pour la plupart, sécrétées par les leucocytes, les cellules endothéliales, la microglie et les astrocytes. Le TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  induisent une augmentation de la synthèse des prostaglandines et de d'autres cytokines pro-inflammatoires menant à l'activation d'un grand nombre de leucocytes. De plus, le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 augmentent l'expression de molécules d'adhésion (ex. ICAM-1) sur les astrocytes, les cellules endothéliales et les leucocytes, facilitant la pénétration de ces derniers dans le système nerveux central. Le TNF $\alpha$  est aussi capable d'activer les cellules gliales, affectant ainsi le remodelage tissulaire, la gliose et la formation de cicatrice dans le parenchyme. En provoquant une augmentation de leur réaction de glycolyse, le TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  nuisent au recaptage du glutamate par les astrocytes, interférant donc avec leur rôle neuroprotecteur. Le

NF $\kappa$ B stimule les gènes précoces de la réponse inflammatoire, amenant une augmentation de la production de protéines de la phase aigue. Ces protéines provoquent une augmentation de l'infiltration leucocytaire, ce qui résulte en une libération de nombreuses autres cytokines pro-inflammatoires dans le milieu (Hatton J, 2001; Kumar V, 2005 Chap 2; McGavin MD, 2007 Chap 3).

#### **4.5 Glutamate**

Lors de trauma, le neuroparenchyme subit une déformation mécanique qui provoque une dépolarisation membranaire importante des neurones (Finnie JW, 2002; Hall ED, 1989). Lors de cette dépolarisation, les neurones ouvrent leurs différents canaux ioniques et relâchent des neurotransmetteurs dans le milieu, notamment le glutamate, un important neurotransmetteur excitateur. Le glutamate active différents récepteurs cellulaires, dont les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), kainate et  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA). Lors de leur activation, ces récepteurs entraînent l'ouverture de canaux ioniques permettant le passage de différents ions dans la cellule, notamment le calcium, le sodium et le potassium. Ce déséquilibre ionique amène une importante entrée d'eau dans la cellule due à la pression osmotique et résulte en une tuméfaction cellulaire (Hatton J, 2001). Cette augmentation significative du calcium intracellulaire provoque l'activation de différents gènes et enzymes, dont des protéases. Ces protéases s'attaquent au cytosquelette cellulaire, ce qui nuit au transport axonal des différentes organelles membranaires et autres composantes cellulaires. Un œdème axonal apparaît en quelques heures suite au déficit de

transport. De plus, la stimulation de récepteurs métabotropiques du glutamate induit l'activation de la phospholipase C par l'intermédiaire d'une protéine G. La phospholipase, par l'action de messagers secondaires, peut provoquer la relâche de calcium normalement séquestré dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique dans le cytosol, contribuant ainsi à l'augmentation de calcium intracellulaire et au déséquilibre électrolytique de la cellule (Hatton J, 2001).

La relâche excessive de glutamate possède d'autres implications. Après une dépolarisation normale, la synapse neuronale est délestée des molécules de glutamate par les cellules astrocytaires environnantes (Montgomery DL, 1994). Celles-ci transforment le glutamate en glutamine par l'action de la glutamine synthétase. La glutamine est retournée dans le milieu extracellulaire et captée par les neurones pour sa reconversion en glutamate. Dans le cas d'une dépolarisation massive, la quantité de glutamate relâchée par les neurones dépasse la capacité de captage des astrocytes du milieu. Une stimulation excessive par le glutamate produit un phénomène d'excitotoxicité et conduit à la mort neuronale.

Le dommage mécanique n'est pas la seule composante du dommage axonal diffus. Les axones endommagés sont également plus sensibles à l'ischémie provoquée par les lésions vasculaires que les axones normaux (Finnie JW, 2002). Les radicaux libres produits lors du trauma peuvent également causer d'importants dommages directs aux neurones (Hall ED, 1989).



#### 4.6 Astrocytes

Les cellules gliales, principales composantes immunitaires du système nerveux central, ont un rôle important à jouer dans la pathogénie de l'hémorragie cérébrale (Finnie JW, 2002). Lors de lésions cérébrales, les concentrations dans le milieu extracellulaire de nombreux ions subissent des changements marqués (Montgomery DL, 1994). Il y a, entre autres, une augmentation du potassium, diminution du sodium, du chlore et du calcium, une baisse de pH, de même qu'une augmentation de certains acides aminés excitateurs. Les astrocytes, étant résistants à ces changements, ont la capacité de capter certains ions et acides aminés afin de préserver l'homéostasie du milieu. Dans certaines conditions, comme dans les cas de traumatismes sévères, leur capacité à tamponner ces changements électrolytiques est insuffisante. De plus, lors de dommages sérieux, la stimulation des récepteurs astrocytaires au glutamate amène une augmentation du calcium intracellulaire. Cette augmentation de calcium intracellulaire initie la peroxydation des lipides membranaires, ce qui inhibe le recaptage du glutamate. Les cellules astrocytaires peuvent également rejeter du glutamate ou d'autres agents neurotoxiques dans le milieu, aggravant le problème. Les astrocytes dans les régions adjacentes au dommage sont généralement dits « réactifs » dû aux changements morphologiques et biochimiques qu'ils subissent (Montgomery DL, 1994; Summers BA, 1995). Parmi ceux-ci, notons une augmentation importante du nombre et de la taille des cellules. Leurs projections cytoplasmiques sont aussi plus nombreuses et plus complexes. En microscopie électronique, les astrocytes démontrent une augmentation marquée de leurs fibrilles cytoplasmiques. Au niveau biochimique,

une augmentation de la quantité d'ADN, de l'activité enzymatique d'oxydoréduction, de la glutamine synthétase et autres enzymes est présente. L'utilisation du glycogène et du glucose est également accrue, de même que la quantité d'ARN mitochondriale de l'apoprotéine E. Tous ces changements sont responsables de l'hypertrophie des cellules astrocytaires, aussi appelée astrogliose. Les cellules astrocytaires peuvent aussi s'hyperplasier (Montgomery DL, 1994). Ce phénomène est appelé astrocytose et dépend de plusieurs facteurs tels que l'âge du patient, l'espèce, le type de dommage et sa localisation dans le cerveau. Généralement, l'hyperplasie-hypertrophie astrocytaire se développe au courant de la première semaine post-traumatique, atteint son paroxysme lors de la deuxième semaine, puis régresse progressivement. Il arrive que des astrocytes réactifs soient encore présents même deux mois post-traumatiques.

Les cellules de la microglie, principales cellules phagocytaires du système nerveux central, sont aussi présentes lors de lésions hémorragiques intracérébrales. Ces cellules, avec l'aide des monocytes amenés sur les lieux lors du bris de la barrière hémato-méningée, vont s'affairer à phagocyter les tissus nécrotiques, notamment les neurones (Kumar V, Chap 28, 2005).

#### **4.7 Neutrophiles**

Les neutrophiles contribuent aussi à la réaction inflammatoire lors d'hémorragie intracérébrale. Il existe une corrélation directe entre l'infiltration neutrophilique du parenchyme et le dommage ischémique cérébral dans ce modèle (Lema PP, 2004). Matsuo et al. ont démontré que lors d'ischémie, il y a une

augmentation des molécules d'adhésion, les intégrines et leurs ligands, induisant l'adhésion endothéliale et la transmigration des neutrophiles (Matsuo Y (b), 1994). Les neutrophiles ayant migré dans le tissu libèrent plusieurs substances dans le but de mettre fin à l'agression. Certaines de ces substances, les protéases par exemple, vont affecter les vaisseaux sanguins environnants et augmenter leur perméabilité (Kumar V, 2005; McGavin MD, 2007; Slauson DO, 2001). Cette augmentation de perméabilité vasculaire amène une augmentation de l'œdème et du volume de l'hématome. Lorsque les molécules liant les neutrophiles à l'endothélium sont inhibées, il y a une diminution de l'œdème cérébral et du volume de l'hématome, ce qui illustre l'importance des neutrophiles lors de ce type de processus (Matsuo Y (a), 1994).

#### **4.8 Érythrocytes**

Certaines composantes des érythrocytes sont susceptibles d'augmenter la perméabilité de la barrière hémato-méningée et contribuer au développement de l'œdème cérébral (Reagan RF, 1998). Les deux principales composantes à avoir été étudiées sont l'hémoglobine et le fer. L'hémoglobine, lorsque retrouvée en milieu extracellulaire, peut activer la peroxydation membranaire des cellules environnantes et, par conséquent, provoquer la mort neuronale. En 2004, Lema et al. ont effectué des colorations de Bleu de Prusse, qui marque le fer ferrique, sur des sections histologiques d'hématome cérébraux (Lema PP, 2004). Ces colorations se sont avérées négatives, suggérant que la toxicité des érythrocytes est due davantage à l'action de l'hémoglobine qu'à celle du fer, un élément oxydant

présent au sein du groupement hème. Les érythrocytes dans le milieu extravasculaire lysent et, en libérant leur hémoglobine, seraient la cause principale de mort neuronale et d'inflammation. Les neutrophiles réactifs présents dans le milieu viendraient exacerber la réaction (Lema PP, 2004).

## **5. CHRONOLOGIE DU DOMMAGE**

Tous ces changements cellulaires surviennent dans un ordre précis (Del Bigio MR, 1996; Rosenberg GA, 1990). Selon le modèle d'hémorragie intracérébrale par injection de collagénase de Rosenberg dans le noyau caudoputamen, le premier changement observable à l'examen histologique est une légère hémorragie dans le neuropile au site d'injection quelques minutes post-injection. Quelques érythrocytes intacts dissèquent le neuropile multifocalement de 20 à 45 minutes après l'injection. Une heure post-injection, les accumulations d'érythrocytes sont toujours multifocales, mais plus importantes. Les érythrocytes dissèquent le tissu en suivant les structures microanatomiques du milieu, i.e. le long des axones ou des vaisseaux sanguins. Deux heures après l'injection, les accumulations sanguines confluent et prennent de l'expansion en ignorant les limites microanatomiques, comme la jonction de la matière grise avec la matière blanche. Les astrocytes environnants sont tuméfiés. À 4 heures, l'épanchement sanguin est extensif, mais il n'y a pas de nécrose tissulaire (malacie). Les neurones au site de l'hématome sont hyperéosinophiliques et caryorrhexiques (nécrotiques). Quelques neutrophiles et astrocytes réactifs sont présents à la périphérie. À ce stade, il y a un œdème cérébral marqué au site d'injection et dans les sections

postérieures. Vingt-quatre heures après l'injection, une importante zone de nécrose avec des érythrocytes extravasculaires et des amas de fibrine est notée au site d'injection. À la périphérie du foyer nécrotique, une mince bande de parenchyme contient de nombreuses cellules gliales, des neurones nécrotiques et viables, des érythrocytes et quelques neutrophiles. La plupart des vaisseaux sanguins présents à cet endroit sont intacts, mais plusieurs renferment des thrombi fibrineux. Quelques neutrophiles sont également trouvés dans le noyau caudé controlatéral. Un œdème cérébral est présent bilatéralement dans les noyaux caudés. À 48 heures, les lésions sont similaires aux précédentes, mais plusieurs érythrocytes sont dégénérés et la pénombre renferme un intense infiltrat de neutrophiles, des érythrocytes intacts et quelques vaisseaux sanguins présentant une hypertrophie endothéliale et quelques cellules mononucléaires dans leur paroi. L'œdème cérébral est toujours présent du côté lésé, mais il tend à se dissiper graduellement au cours des jours suivants. Une semaine post-injection, la nécrose tissulaire, caractérisée par de nombreuses « cellules fantômes » et érythrocytes dégénérés, est évidente. La pénombre est infiltrée par de nombreux macrophages renfermant des gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme et il y a de la néovascularisation. À trois semaines, la zone nécrotique est remplacée par une cavité traversée par de délicates travées gliovasculaires. De nombreux astrocytes réactifs sont présents à la périphérie (Rosenberg GA, 1990; Del Bigio MR, 1996; Lema PP, 1994).

## 6. CHANGEMENTS COMPORTEMENTAUX

Tous ces changements histopathologiques au noyau caudoputamen sont associés à des changements du comportement moteur des animaux (Jolicoeur FB, 1992). Chesney et al ont démontré que les animaux ayant subis des hémorragies intracérébrales dans le noyau strié (comprenant le noyau caudoputamen) par le modèle d'injection de collagénase éprouvaient des déficits locomoteurs à court et long termes (Chesney JA, 1995). Ils évaluèrent le comportement moteur rotationnel en réponse à l'apomorphine et à l'amphétamine, de même que l'initiation du mouvement. Une importante asymétrie fut notée lors des examens de rotation suite à l'injection d'apomorphine et d'amphétamine et ce durant plusieurs jours (jusqu'à 70 jours pour l'examen du comportement rotationnel suite à l'injection d'apomorphine). L'initiation du mouvement a été évaluée huit semaines post-chirurgie et une diminution d'environ 50% fut notée du côté lésé. Des résultats normaux ont été recueillis du côté non lésé. Lors d'une étude, Lema et al. ont évalué des rats ayant subi le même modèle d'hémorragie intracérébrale selon huit différents tests semi-quantitatifs, soit le niveau d'activité, la locomotion, la passivité positionnelle, le positionnement visuel, l'escalade, la rigidité de la queue, les tremblements et le sautillerment (Lema PP, 2004). Ces tests ont été choisis à partir de publications antérieures (Del Bigio MR, 1996; Irwin S, 1968; Lema PP, 2004; Oliver JE, 1993; Vachon P, 1999). Les évaluations ont été effectuées 48 heures post-chirurgicalement. Par rapport à l'évaluation pré-chirurgie, les animaux lésés ont tous obtenu un pointage nettement inférieur après la chirurgie. Les animaux exprimaient alors un important déficit d'initiation du mouvement, des

tremblements et de la rigidité musculaire. Lema et al ont répété le modèle et ont rajouté dans leur évaluation du comportement moteur l'épreuve du Rotarod testant la coordination motrice (Lema PP, 2005). Encore une fois, les animaux lésés ont obtenu des pointages significativement inférieurs après la chirurgie comparativement à leurs résultats pré-chirurgicaux.

## **7. APPROCHES THÉRAPEUTIQUES**

Tel que mentionné précédemment, les problèmes cérébraux secondaires tels que l'ischémie, l'œdème et l'augmentation de pression intracrânienne peuvent être modulés pharmacologiquement à différents degrés (Finnie JW, 2002). Puisque ces manifestations sous-tendent des processus cellulaires et moléculaires variés, plusieurs approches thérapeutiques ont été mises de l'avant par les chercheurs.

### **7.1 Inhibiteurs de l'apoptose**

La mort cellulaire survenant lors de trauma cérébral pouvant être due à l'apoptose, différents inhibiteurs de l'apoptose sont présentement à l'étude, notamment des inhibiteurs de caspases (ex. caspase-3), des modulateurs de la protéine neuronale de l'inhibition apoptotique (neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP) et des inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) (Hatton J, 2001; Wang KK, 2006). Bien que plusieurs chercheurs affirment que ces molécules sont théoriquement intéressantes (Charriaut-Marlangue C, 2004; Robertson GS, 2000; Hara H, 1999), la littérature scientifique recèle peu de résultats concrets à ce jour. Par contre, Wei et al. ont démontré que l'inhibition de

la poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG), une enzyme associée à la PARP , réduit de façon significative la formation d'infarctus cérébral et l'apparition de déficits neurologiques chez le rat suite à l'induction de lésions ischémiques (Wei 2007). Dans une étude récemment publiée, Plesnila et al. ont aussi obtenu des résultats intéressants en inhibant la molécule p53, impliqué dans les différents mécanismes de l'apoptose, chez des souris ayant subi un dommage traumatique cérébral (Plesnila N, 2007). Malgré de d'autres études sont nécessaires, ces dernières suggèrent que les inhibiteurs de l'apoptose seraient une option prometteuse dans le traitement de l'hémorragie intracérébrale.

## **7.2 Agents anti-oxydants**

Afin de contrer l'effet des radicaux libres et de la peroxydation membranaire, certains agents anti-oxydants, tels que la vitamine E, ont été administrés antérieurement à la chirurgie ou tôt après celle-ci (Hall ED, 1989). Il s'est avéré que ce traitement aidait à conserver la vascularisation du parenchyme nerveux (Peeling J, 1998). Puisque le calcium exacerbe la peroxydation membranaire et que l'enzyme prostaglandine synthétase est une source importante de radicaux libres, les bloqueurs de canaux calciques et les inhibiteurs de la cyclooxygénase ont des effets comparables aux anti-oxydants (Hall ED, 1989; Del Bigio MR, 1996). Certains auteurs prétendent également que la naloxone, un antagoniste des opioïdes, aurait des effets bénéfiques, à fortes doses, sur les dommages secondaires au trauma par son effet inhibiteur de la peroxydation



membranaire et de la relâche de radicaux libres par les neutrophiles (Hall ED, 1989).

### **7.3 Inhibiteurs des récepteurs NMDA**

Malgré leur rôle important dans le développement des lésions secondaires au trauma cérébral, l'inhibition des récepteurs NMDA ne s'avère que peu bénéfique jusqu'à maintenant. Différents types d'antagonistes ont été développés : les antagonistes compétitifs et non compétitifs du glutamate, les antagonistes de la glycine (cofacteur du glutamate sur ces récepteurs) et les bloqueurs de canaux ioniques. Certains d'entre eux ont provoqué des hallucinations, psychose et autres effets neurologiques néfastes chez les humains. De plus, les essais chez le rat ont démontré la formation de vacuoles et de nécrose neuronale dans le cortex cingulaire. Aussi, leurs effets inhibiteurs de la synaptogénèse nuiraient à la formation de nouvelles connexions neuronales lors du développement donc les inhibiteurs des récepteurs NMDA ne pourraient pas être utilisés chez les patients en bas âge. Les canaux ioniques des récepteurs NMDA au repos sont bloqués par un ion de magnésium. Lors de lésion cérébrale, il y aurait une diminution significative du magnésium ionisé dans le milieu. L'apport de chlorhydrate ou de sulfate de magnésium en réponse à un trauma cérébral conduirait à un meilleur pronostic (Hatton J, 2001; Wang KK, 2006).

#### **7.4 Inhibiteurs calciques**

L'augmentation du calcium intracellulaire étant un point critique lors de dommages cellulaires, son inhibition serait logiquement thérapeutique. Pourtant, les bloqueurs de canaux calciques interfèrent aussi avec l'entrée de calcium dans les cellules au niveau périphérique. Ceci amène des effets secondaires importants, notamment une diminution de la pression sanguine entraînant une réduction marquée de la perfusion cérébrale générale et entraîne, par conséquent, des lésions ischémiques étendues (Compton JS, 1990). De plus, l'augmentation de calcium dans les neurones étant le fruit de plusieurs mécanismes, il est difficile d'élaborer un traitement capable d'agir à tous les niveaux. Pour ces raisons, l'utilisation d'antagonistes au calcium est peu pratiquée dans les cas de traumatismes crâniens (Hatton J, 2001).

#### **7.5 Cyclosporine**

La cyclosporine est un agent immunosuppresseur utilisé en médecine vétérinaire (Plumb DC, 2005; Robson D, 2003). Elle cause entre autres une inhibition des lymphocytes T. Elle peut aussi inhiber l'ouverture des pores au calcium présents sur les membranes mitochondriales, prévenant ainsi sa relâche et son accumulation excessive et, par conséquent, prévient l'activation des caspases par le calcium. En situation normale, les propriétés physicochimiques de la cyclosporine limitent sa pénétration dans le système nerveux central. Mais puisque la barrière hémato-méningée est endommagée dans les cas d'hémorragies cérébrales, la molécule peut atteindre le parenchyme (Vachon P, 2002). Différentes

études ont démontré que lors de son administration en phase post-traumatique, la cyclosporine a des effets neuroprotecteurs et cause une diminution significative du volume de l'hématome intracérébral (Hatton J, 2001; Vachon P, 2002).

### **7.6 Facteurs de croissance**

Différents facteurs de croissance, tels que le BDNF, le IGF-1 et le FGF, sont produits par les cellules gliales et ont des propriétés neuroprotectrices. Leur administration suite à un trauma crânien pourrait être intéressante, mais plusieurs points restent à éclaircir. D'abord, y a-t-il une diminution significative de ces facteurs de croissance lors de lésions cérébrales? Est-ce que l'administration de facteurs de croissance exogènes serait vraiment profitable? Est-ce que ces facteurs de croissance exogènes sont capables d'atteindre le système nerveux central? (Hatton J, 2001). L'utilisation de ces facteurs pour le traitement du trauma cérébral est considéré prématurée.

### **7.7 Corticostéroïdes**

Grâce aux propriétés anti-inflammatoires et de stabilisation membranaire des corticostéroïdes, leur utilisation a été envisagée par de nombreux chercheurs avec des résultats mitigés. Certains chercheurs (Braakman R, 1983; Del Bigio MR, 1996) ne voient aucun avantage à leur utilisation, alors que d'autres ont conclu à leur efficacité (Emerson TE, 1979; Hall ED, 1985; Hall ED, 1993; Lema PP, 2004; Lema PP, 2005; Vachon P, 2003). En 1989, Hall et al. ont démontré que la prednisone et la méthylprednisolone s'avèrent efficaces dans le traitement des

dommages cérébraux, mais nécessitent de fortes doses afin d'obtenir un effet optimal. Par contre, l'hydrocortisone semble n'avoir aucun effet (Hall ED, 1989). Par ailleurs, en 2004, Lema et al. ont prouvé l'efficacité de la dexaméthasone dans le traitement de l'hémorragie intracérébrale (Lema PP, 2004). En effet, l'administration de faibles doses de dexaméthasone une heure après l'induction de l'hémorragie amène une diminution significative du volume de l'hématome, du nombre de neutrophiles et d'astrocytes réactifs au sein de la lésion et à sa périphérie, de même qu'une diminution des changements vasculaires tels que la formation de manchons périvasculaires, de vasculites et de nécrose endothéliale. Aucun changement significatif n'a été décelé en regard au nombre de neurones nécrotiques à la périphérie de la lésion, mais le volume de l'hématome étant réduit, le nombre absolu de neurones nécrotiques dans le cerveau en sera diminué. Donc, certains corticostéroïdes pourraient s'avérer efficaces pour le traitement de l'hémorragie intracérébrale. La méthylprednisolone pourrait amener les mêmes changements bénéfiques que la dexaméthasone, mais ceux-ci se sont avérés significatifs uniquement chez les animaux recevant de fortes doses de méthylprednisolone.

Dans toutes les études citées précédemment (Lema PP, 2005; Lema PP, 2004; Vachon P, 2003), l'administration du traitement était effectuée tôt après l'induction de l'hémorragie (une heure post-injection), voire même avant la chirurgie (Hall ED, 1989). Or, ceci ne correspond pas à la réalité clinique de la médecine vétérinaire. Comme les lésions cérébrales peuvent être sous-cliniques durant plusieurs heures après le dommage initial et ne devenir apparentes que lors

d'une augmentation significative de la pression intra-crânienne ou lors d'herniation cérébrale (Hall ED, 1989), il arrive fréquemment que les cliniciens soient amenés à prodiguer des traitements plusieurs heures après le trauma initial. Par contre, lors de chirurgie crânienne, il serait intéressant d'utiliser de telles drogues anti-inflammatoires en prévention de complications post-chirurgicales.

## **8. OBJECTIF**

Dans la présente étude, nous avons voulu démontrer l'effet du délai dans le traitement de l'hémorragie intracérébrale à la dexaméthasone. Nous espérons que cette étude saura aider les cliniciens vétérinaires dans la caractérisation de la fenêtre thérapeutique offerte à eux lors d'hémorragie intracérébrale.

**METHODOLOGIE**  
**ARTICLE**

**Effect of delay on the outcome of dexamethasone treatment of collagenase-induced intracerebral hematoma in rats**

Claudine Savard DVM, Pascal Vachon DMV, PhD, DACLAM, Guy Beauchamp Ph. D, Pierre Hélie DMV, DACVP.

Faculty of Veterinary Medicine, Departments of Veterinary Biomedicine and Microbiology and Pathology, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6

**Acknowledgements**

This work was supported by the Fond du Centenaire de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal. We would like to thank Robin Turcotte, Jacinthe Cardin, Jules Deslandes and Josée Letellier for their technical assistance.

**Corresponding author:**

Pierre Hélie DMV, DACVP

Faculté de Médecine Vétérinaire

Département de Pathologie et Microbiologie

C.P. 5000

Saint-Hyacinthe, Qc

J2S 7C6

Phone: [information retirée / information withdrawn]

Fax: [information retirée / information withdrawn]

E-mail: [information retirée / information withdrawn]

**Abstract**

**Objective-** The effect of delay in the treatment of intracerebral hematoma with dexamethasone (DM) was evaluated in a rat model using a subcortical collagenase injection.

**Animals-** Thirty male Sprague-Dawley rats between 185-230g body weight were used in this study.

**Procedures-** Dexamethasone (DM) was administered intraperitoneally to treatment groups at a concentration of 1mg/kg at 2 h, 4 h or 6 h following the intracerebral collagenase injection and a similar dose was administered 24 h later. A neurological examination and a rotarod treadmill test were used to evaluate motor behaviour in rats prior to, as well as 24 h and 48 h following intracerebral injection. Animals were euthanized after the last neurological exam at 48 h. Brains were evaluated for hematoma size, number of penumbral necrotic neurons and neutrophil and astrocytic response.

**Results-** Results showed that animals treated 2 h following the intracerebral collagenase injection performed significantly better on the neurological exam and the rotarod test compared to the control group and groups treated at 4 h and 6 h. Hematoma volume was significantly smaller in all treated groups, but did not differ between treatment groups. Fewer neutrophils were seen in the penumbra of the hematoma of all treated animals. The number of necrotic neurons in the penumbra was unchanged between treatment groups.



**Conclusions and Clinical Relevance-** These results indicate that a 1mg/kg dose of dexamethasone is beneficial for the treatment of intracerebral hemorrhage, particularly if administered within the first 2 hours following the induction of the hemorrhage.

### **Abbreviations**

DM – Dexamethasone

MP – Methylprednisolone

IP – intraperitoneally

GFAP - glial fibrillary acidic protein

SD – standard deviation

CNS – central nervous system

### **Introduction**

Cerebral hemorrhages due to trauma or stroke are diagnostic and therapeutic challenges in human and veterinary medicine. The efficacy of corticosteroids has been evaluated in different natural and experimental studies with conflicting results <sup>1, 2, 3, 4</sup>. Animal models of cerebral hemorrhage have been useful to study the pathogenesis and treatment of cerebral hemorrhage <sup>5</sup>. Rosenberg and al. have developed a highly reproducible collagenase-induced model of intracerebral hematoma that mimics the release of endogenous collagenase by leukocytes at the site of cerebral trauma <sup>6</sup>. Using this model, certain corticosteroids like dexamethasone (DM) and methylprednisolone (MP) administered 1h after inducing

the hematoma have been shown to be beneficial for rats with experimentally-induced intracerebral hematoma <sup>2, 3, 7</sup>. However, the delay between trauma and treatment might influence the response of the animal to corticosteroid treatment. This is important as it more accurately reflects the clinical situation.

The aim of this study was to assess the motor performance and some histopathological parameters associated with 2 h, 4 h and 6 h delays in DM treatment following an intracerebral collagenase-induced hematoma. Hematomas were induced in the caudoputamen nucleus. This choice has been made taking in consideration that this nucleus has an adequate size and that its alteration produced assessable deficits in the animal's motor behaviour. This study should help determine the critical time period during which the DM treatment must be administered to have significant beneficial effects on the outcome of an intracerebral hemorrhage.

## **Materials and methods**

### **Animals**

Twenty-eight male Sprague-Dawley rats<sup>a</sup> between 185-230g body weight were used in this study. Following arrival, they were housed in a standard environment (fresh filtered air: 15 changes/h, temperature:  $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , humidity: 40-60% and light-dark cycle: 12h:12 h). They were pair-housed in polycarbonate cages<sup>b</sup> on hardwood bedding<sup>c</sup> and acclimated for 5 days prior to the initiation of the study. Rats received tap water and rodent chow<sup>d</sup> *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the University of Montreal's Faculty of Veterinary Medicine

Institutional Animal Care and Use Committee prior to animal use in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care<sup>8</sup>.

### **Experimental design**

Dexamethasone<sup>c</sup> (1mg/kg)<sup>7</sup> was administered intraperitoneally (IP) to the 3 different treatment groups at 2 h, 4 h or 6 h following the intracerebral collagenase injection. A second DM dose was administered 24 h later. The control group received an intracerebral injection of collagenase but no treatment. Behavioral evaluations (rotarod treadmill and neurological exam) were performed on all animals at 24 and 48 h following the intracerebral collagenase injection. After the 48 h neurological exam, animals were euthanized and were sampled for brain histopathology.

### **Surgical procedures**

The surgical procedures have been previously described <sup>2</sup>. Following anesthesia with isoflurane<sup>f</sup>, rats were placed in a stereotaxic instrument<sup>g</sup>. A sagittal skin incision was made and a burr hole (1.5 mm diameter) was drilled in the bone at the following stereotaxic coordinates: antero-posterior 0.0 mm and lateral 3.0 mm, in reference to bregma, so that the injection site would be in the right caudoputamen nucleus <sup>9</sup>. To induce the hematoma, a collagenase solution composed of 0.5 U collagenase Type VII<sup>h</sup> in 2µL saline<sup>i</sup> was injected manually over a period of 10 min via the burr hole in the right caudoputamen nucleus, 5 mm below the dura with a 5 µL Hamilton syringe. The needle was removed 5 min following the end of the

injection and the skin was sutured. Rectal temperature was monitored during surgery<sup>j</sup> and was maintained within 36.5 - 37.5°C throughout the surgery by keeping animals on an electric heating pad. Following surgery, animals were maintained under a heating lamp until fully awake.

### **Behavioral evaluations**

A semi-quantitative neurological exam was used to evaluate the motor performance of the rats prior to and at 24 and 48 h following surgery. This exam has previously been described<sup>2</sup>. All animals were trained for 3 consecutive days prior to the baseline neurological exam. This neurological exam, scored between 0 (poor or absent) and 4 (normal performance), was composed of the following tests: activity, locomotion, positional passivity, visual positioning, climbing, tail rigidity and tremor.

Animals were also tested on a rotarod treadmill<sup>k</sup>. Following training, rats were evaluated prior to and at 24 and 48 h following surgery by setting the rotarod to the acceleration mode of 5 to 35 revolutions per min over 5 min. The maximum time the rat stayed on the rotarod, up to a total time of 5 min, was recorded for each performance. A mean of 3 trials was used to represent animal performance. Values were reported as a percentage of individual baseline evaluations.

### **Perfusion, histological procedures, immunohistochemistry and image analysis**

Following the neurological assessment at 48 h post-injection, the animals were perfused through the heart under deep anesthesia (pentobarbital<sup>l</sup>; 100 mg/kg, IP)

first with a physiological dextrose-sucrose solution (200 mL/rat; solution composition (1L): 8 g NaCl, 4g dextrose, 8 g sucrose, 0.23 g calcium chloride<sup>m</sup>) followed by a 10% buffered formalin (200 mL/rat) solution. For microscopic evaluation, brains were fixed in formalin for 48 h and embedded in paraffin; 5 µm transverse sections were taken every 100 µm from start to end of the hematoma and were stained with hematoxylin and eosin. Hematoma volume evaluation and cell counts (4 fields at 200 X for the penumbral area) were performed with an image analysis system<sup>n</sup>. Hematoma volume was calculated by multiplying the hematoma surface area by the distance between two consecutive (100µm) brain sections. In addition, the number of neutrophils and necrotic neurons in the penumbra were evaluated by histomorphometry. Necrotic neurons were identified by the characteristic size and tint that occur when a neuron becomes pyknotic. The same parameters were used to evaluate each slide. The number of necrotic neurons was evaluated in the penumbral area of the hematoma. To determine astrocytic reactivity, immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP) was conducted using polyclonal antibodies<sup>o</sup>.

### **Statistical analysis**

Post-operative values for neurological examination and rotarod were expressed as a percentage of pre-operative values for each individual. T-tests, based on the estimates produced by the linear models, were used to assess whether the changes in the behavioural examinations and the rotarod performances at 24 or 48 hours following treatment were significantly different from pre-operative values. Unequal

variance linear models with treatment (4 levels: control, treated at 2, 4 or 6 hours) as a between-subject factor were used for each element evaluated (neurological exam, rotarod performances, volume of hematomas, neutrophils and necrotic neurons counts). When the treatment effect proved significant, a priori contrasts were used for pairwise comparisons of treatment means. Statistical analyses were carried out with SAS<sup>P</sup>. The level of significance was set at 0.05.

## **Results**

### **Behavioral and rotarod treadmill evaluations**

All animals showed typical clinical signs of a caudoputamen nucleus alteration<sup>10</sup>, but with different intensity.

The semi-quantitative neurological exam as well as the rotarod test demonstrated a beneficial effect of treatment ( $p = 0.02$ ) (Figures 1 and 2). However, neurological scores and rotarod performances did not vary significantly for all treatment groups (a priori contrasts).

Twenty-four hours post-surgery, all groups (treated and control) showed a drop in their behavioral scores and rotarod performances compared with their pre-surgery results. Animals treated 2 h after the intracerebral collagenase injection had significantly higher scores in their behavioral and rotarod evaluations when compared to the control group ( $p = 0.01$ ) but not when compared to the 4 h and 6 h treated groups. At 24 h, average neurological scores were reduced to  $73 \% \pm 19 \%$  and rotarod results were reduced to  $48 \% \pm 28 \%$  of baseline values in the group treated at 2 h post-surgery. The three other groups (control, 4 h and 6 h DM treated

groups) showed an average reduction of their neurological scores to  $55 \% \pm 9\%$  and of their rotarod performances to  $20 \% \pm 17 \%$  compared to baseline values following collagenase injection in all groups.

The most striking effects were noted 48 h following surgery. Animals treated with DM 2 h post-surgery had a significantly higher neurological scores than controls ( $p = 0.003$ ), animals treated at 4 h ( $p = 0.01$ ) and animals treated at 6 h ( $p = 0.01$ ). With the rotarod test, animals treated at 2 h after the injection had significantly higher scores than animals treated at 6 h ( $p < 0.004$ ) or the control group ( $p < 0.01$ ). At 48 h following collagenase injection, average behavioural scores were reduced to  $55 \% \pm 12 \%$  of baseline values in animals treated at 4 h post-op, 6 h post-op and in non-treated animals. Behavioral scores of animals treated 2 h after the surgery were at  $84 \% \pm 21 \%$  of their mean before the surgery but this drop was not significant ( $p > 0.05$ ). On the rotarod test, the performances were reduced to  $24\% \pm 25\%$  in all groups except for the animals treated 2 h after surgery. In this group, performances on the rotarod were reduced only to  $65\% \pm 31\%$  of their pre-operative results.

### **Histopathological evaluation**

The hematoma zone consisted of clusters of erythrocytes, cellular debris, neutrophils, and necrotic parenchyma. No macrophages were detected. Clear spaces within the neuropil, interpreted as edema, surrounded the penumbral region and extended along the corpus callosum in the ipsilateral and contralateral hemispheres. The hematoma volume was significantly smaller ( $p < 0.02$ ) in all DM

treated animals ( $12.5 \pm 2.17 \text{ mm}^3$  at 2 h,  $16.6 \pm 2.46 \text{ mm}^3$  at 4 h and  $16.7 \pm 2.46 \text{ mm}^3$  at 6 h after collagenase injection) when compared to non-treated animals ( $26.4 \pm 2.66 \text{ mm}^3$ ), however there was no difference between treated groups (Figure 3). Significant differences in the number of selected cell types were observed with treatment. Neutrophils were observed at the periphery of the lesion. They were more abundant in controls ( $1581 \pm 123$ ) than in DM-treated animals (2 h, 4 h and 6 h:  $710 \pm 100$ ,  $883 \pm 114$  and  $1097 \pm 114$ , respectively) ( $p < 0.008$ ). Animals treated 6 h after intracerebral collagenase injection had significantly higher neutrophils counts than animals treated at 2 h post-op ( $p < 0.02$ ) (Figure 4). No significant difference was observed in the number of necrotic neurons (positive controls:  $223 \pm 36$ ) compared to treated animals ( $148 \pm 33$ ,  $219 \pm 33$  and  $298 \pm 33$  following 2h, 4h and 6h post-op DM treatment, respectively) (Figure 5).

Some histopathological changes such as vasculitis, presence of erythrocytes and reactive astrocytes were observed but not counted. Vasculitis was characterized by infiltration of inflammatory cells, fibrin deposits and loss of integrity of the vascular wall. Astrocytic cells were reactive since they were plump and had numerous cytoplasmic projections, as shown by immunohistochemistry stains. According to our qualitative observations, no differences were noted between animals treated 4 h and 6 h after surgery and non-treated animals, however in the group treated 2 h after the insult, fewer erythrocytes and fewer important vascular changes were seen and less neuronal degeneration was present.



## Discussion

Behavioral and histopathological results indicate that the administration of a 1mg/kg dose of dexamethasone intraperitoneally within a 2 h time frame following the induction of an intracerebral hematoma is beneficial and effective to minimize the size of the hematoma and its repercussions on motor behavior. Animals treated 2 h after the intracerebral collagenase injection had better behavioral and rotarod performances than treatments administered at 4 h and 6 h after trauma. This effect appeared as soon as 24 h and persisted until 48 h following intracerebral trauma.

The size of the hematoma is related to neurological deficits observed after the trauma. Cerebral hematomas create a compression of the neuroparenchyma, resulting in neuronal degeneration and neurological deficits, mainly because they are space occupying and because of the swelling due to the cerebral edema surrounding the hemorrhage <sup>5</sup>. At 48 h, the volume of the hematoma was significantly decreased in treatment groups compared to control.

The administration of dexamethasone seems to decrease the number of neutrophils seen in the lesions of all treated groups (2h, 4h and 6h). Although the reduction in neutrophils counts was similar in all treated groups, the reduction tends to be smaller as the delays between the injury and the dexamethasone administration is getting longer. Neutrophils have been associated with ischemic damage in the brain <sup>11</sup>. A direct correlation has been established between neutrophil infiltration and ischemic brain injury<sup>11</sup>. The inhibition of neutrophil cell adhesion molecules reduces neutrophil endothelial adhesion and transmigration resulting in reduced edema formation and hematoma size<sup>12</sup>. Since corticosteroids, like

dexamethasone, reduce neutrophil margination, this may explain in part the smaller volume.

The number of necrotic neurons present in the penumbra of the hematoma did not vary significantly between treated and non treated animals. Our results do not show a decrease in the number of necrotic neurons per field between the treated and non treated animals. But since the total volume of the hematoma is significantly reduced, the absolute number of necrotic neurons surrounding the damaged parenchyma is suspected to be smaller and thus likely explains the behavioral and rotarod results.

Astrocytes were present in the penumbra of the hematoma in every group (treated and control) and showed characteristics of hypertrophy easily seen with GFAP immunocytochemistry techniques (increase in body cell size, increase of the length and number of the cytoplasmic projections). Astrocytic swelling occurs in CNS conditions such as head trauma and hypoxia-ischemia. Increases in extracellular potassium, intracellular calcium and excitatory neurotransmitters like glutamate are other causes of astrocytic hypertrophy and hyperplasia. Astrocytes may prevent neuronal necrosis by maintaining regional homeostasis<sup>12, 13</sup>.

Corticosteroids have been extensively used in the treatment of acute spinal cord and brain trauma<sup>14</sup>. Corticosteroids prevent vasoconstriction<sup>15</sup>, promote dilatation of the central vasculature<sup>16</sup>, inhibit lipid peroxidation, have antioxidative properties<sup>13</sup> and preserve the Na-K/ATPase activity<sup>17</sup>. All these mechanisms tend to have neuroprotective effect on the brain following cerebral hemorrhage and could explain their efficacy.

Previous studies have shown that corticosteroids administered shortly after the induction of an intracerebral hemorrhage, at a dosage of 1 mg/kg<sup>7</sup>, is beneficial for the treatment of cerebral hematoma<sup>2, 3</sup>. Altogether these results suggest that even if the administration of 1 mg/kg of dexamethasone is having a beneficial effect on the behavioral and histopathological changes happening after an intracerebral hemorrhage, the treatment is more effective if administered within the first 2 hours after the insult. Delays in dexamethasone administration are associated with a reduction of neurological performances. Histopathological parameters evaluated did not significantly reflect this but showed a clear tendency toward it.

In conclusion, the administration of a 1 mg/kg dose of dexamethasone for the treatment of intracerebral hemorrhage appears to be beneficial when administered within 2 h after the insult. Glucocorticoids allowing a longer time frame and therefore more practical in clinical situations should now be investigated.

## Footnotes

- a. Charles River, St-Constant, Qc, Canada
- b. Ancare, Bellmore, NY, USA
- c. Beta chip, Northeastern Products Co., Warrenburg, NY, USA
- d. Charles River Rodent Chow 5075, St-Constant, Qc, Canada
- e. (Professional Veterinary Laboratories, Winnipeg, MB, Canada)
- f. (Aerrane, Baxter, Mississauga, ON, Canada
- g. (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)
- h. (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)
- i. (Abbott Laboratories, St-Laurent, QC, Canada)
- j. (Thermalert TH-8, Physitemp, Clifton, NJ, USA)
- k. (ENV-576, Med Associates Inc., St-Albans, VT, USA.)
- l. (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada)
- m. (Sigma Inc., St-Louis, MO, USA)
- n. (Simple PCI, Compix Inc. Imaging Systems, Cranberry Township, PA, USA)
- o. (BioGenex Laboratories, San Ramon, CA, USA and Vectastain ABC kit, Burlingame, CA, USA)
- p. SAS, version 9.1, Cary, N.C

## References

1. Braakman R, Schouten HJ, Blaauw-van Dishoeck M, et al. Megadose steroids in severe head injury. Results of a prospective double-blind clinical trial. *J Neurosurg* 1983;58(3):326-330.
2. Lema PP, Girard C, Vachon P. Evaluation of dexamethasone for the treatment of intracerebral hemorrhage using a collagenase-induced intracerebral hematoma model in rats. *J Vet Pharmacol Ther* 2004;27(5):321-328.
3. Lema PP, Girard C, Vachon P. High doses of methylprednisolone are required for the treatment of collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Can J Vet Res* 2005;69(4):253-259.
4. Hall ED. High-dose glucocorticoid treatment improves neurological recovery in head-injured mice. *J Neurosurg* 1985;62(6):882-887.
5. Finnie JW, Blumbergs PC. Traumatic brain injury. *Vet Pathol* 2002;39(6):679-689.
6. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 1990;21(5):801-807.
7. Vachon P, Moreau JP. Low doses of dexamethasone decrease brain water content of collagenase-induced cerebral hematoma. *Can J Vet Res* 2003;67(2):157-159.

8. Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Ottawa: Canada, 1993
9. Paxinos, G. And C. Watson, The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego: Academic Press.1998
10. Jolicoeur FB and Rivest R, Rodent models of Parkinson's disease, *Neuromethods* 1992, 21: 135-58
11. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, et al. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 1994;25(7):1469-1475.
12. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, et al. Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain res* 1994;656(2):344-352.
13. Montgomery DL. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol* 1994;31(2):145-167.
14. Hall ED. Neuroprotective actions of glucocorticoid and non glucocorticoid steroids in acute neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol* 1993;13(4): 415-432.
15. Emerson TE, Raymond RM. Methylprednisolone in the prevention of cerebral hemodynamic and metabolic disorders during endotoxin shock in the dog. *Surg Gynecol Obstet* 1979;148(3):361-366.

16. Fox JL, Yasargil MG. The relief of intracranial vasospasm: an experimental study with methylprednisolone and cortisol. *Surg Neurol* 1975;3(4):214-218.
17. Ildan F, Polat S, Gocer AI, et al. The effect of the treatment of high-dose methylprednisolone on Na(+)-K(+)/Mg(+2) ATPase activity and lipid peroxidation and ultrastructural findings following cerebral contusion in rats. *JSurg Neurol*, 1995;44(6):573-580.

### Legend to Figures

**Figure 1.** Representation of mean neurological scores expressed as a percentage of the rats pre-op performances ( $\pm$  SD) following treatment (24 and 48 h post surgery) in Sprague Dawley rats that received intracerebral collagenase without (control group (black)) and with intraperitoneal dexamethasone treatment at 2 h (checked), 4 h (light grey) and 6 h (striped) after collagenase injection.

At 24 h after the intracerebral collagenase injection,  $p = 0.01$  for DM treated animals at 2 h when compared to control group. At 48 h post surgery,  $p = 0.003$  when the same groups are compared. (\*)

**Figure 2.** Representation of mean rotarod scores as a percentage of the rats pre-op performances ( $\pm$  SD) following treatment (24 and 48 h post surgery) in Sprague Dawley rats that received intracerebral collagenase without (control group (black)) and with intraperitoneal dexamethasone treatment at 2 h (checked), 4 h (light grey) and 6 h (striped) after collagenase injection.

At 24 h after the intracerebral collagenase injection,  $p = 0.01$  for DM treated animals at 2 h when compared to control group. At 48 h post surgery,  $p < 0.01$  when the same groups are compared. (\*)

**Figure 3.** Representation of mean intracerebral hematoma volume in  $\text{mm}^3$  ( $\pm$  SD) 48 h after intracerebral collagenase injection in Sprague Dawley rats without



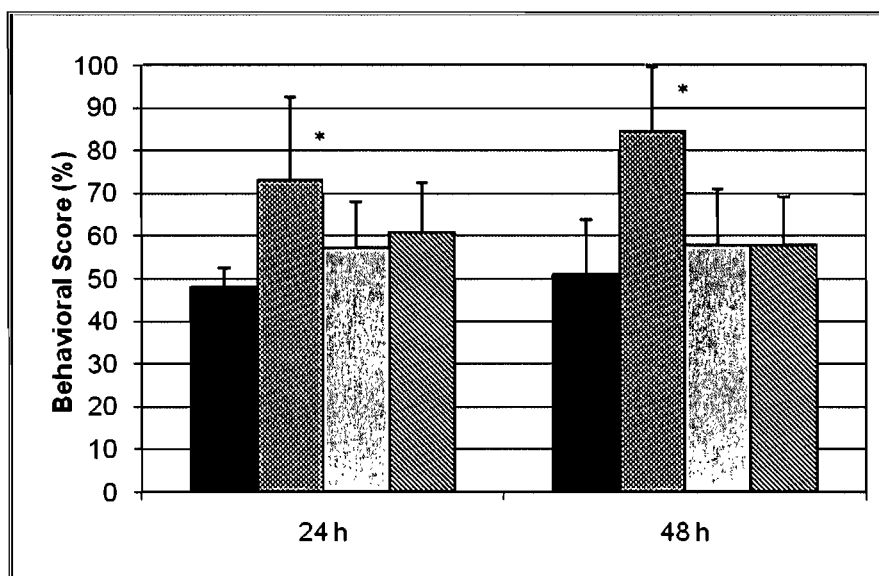
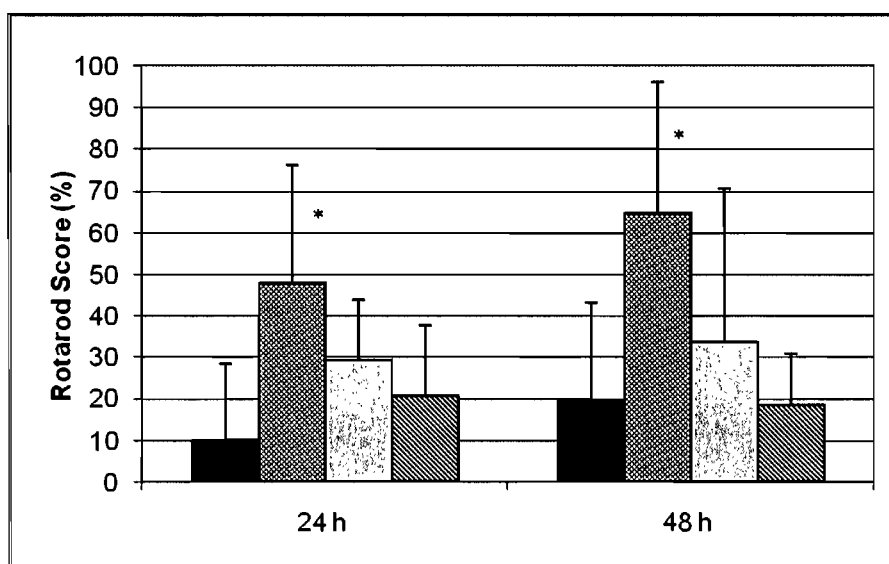
(control group) and with intraperitoneal dexamethasone treatment at 2 h, 4 h and 6 h after surgery.

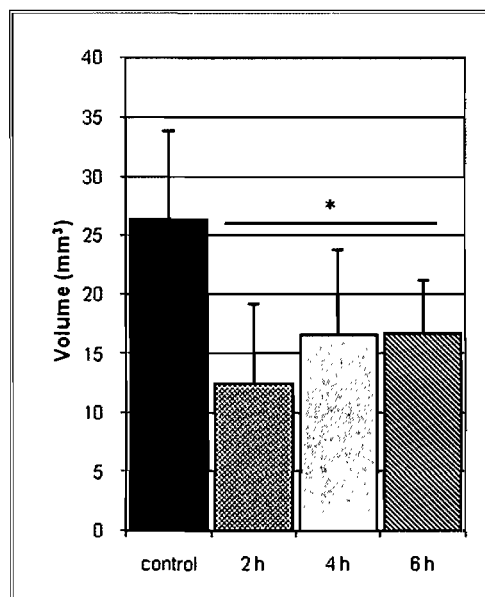
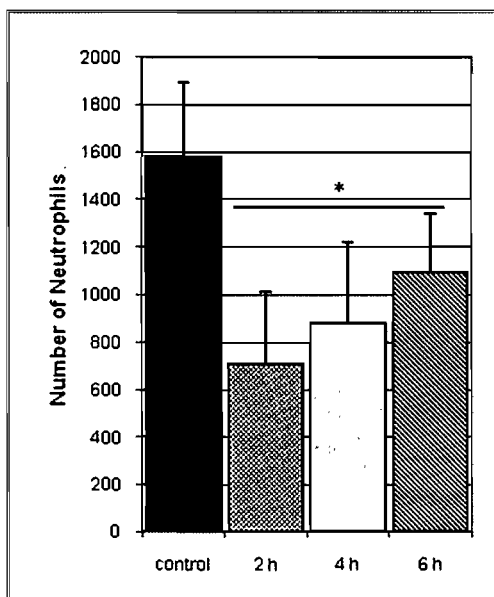
$p < 0.02$  for all treated groups when compared to the control animals (\*)

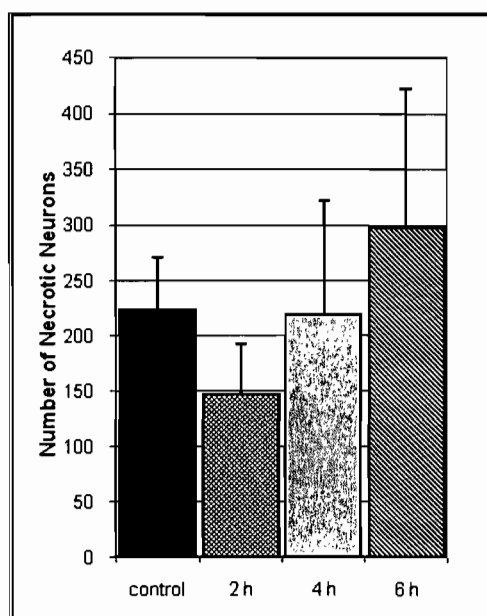
**Figure 4.** Representation of mean neutrophil counts ( $\pm$  SD) 48 h after intracerebral collagenase injection in Sprague Dawley rats without (control group) and with intraperitoneal dexamethasone treatment at 2 h, 4 h and 6 h after surgery.

$p < 0.008$  for all treated groups when compared to the control animals (\*)

**Figure 5.** Representation of mean necrotic neuron counts ( $\pm$  SD) 48 h after intracerebral collagenase injection in Sprage Dawley rats without (control group) and with intraperitoneal dexamethasone treatment at 2 h, 4 h and 6 h after surgery. There is no significant difference in the necrotic neuron count between control and DM treated groups.

**FIGURES****Figure 1.****Figure 2.**

**Figure 3.****Figure 4.**

**Figure 5.**

## **DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS**

## **1. Introduction**

L'utilisation de corticostéroïdes dans le traitement de l'hémorragie cérébrale soulève des interrogations et celles-ci ne peuvent être résolues que par une expérimentation rigoureuse couvrant les nombreux aspects de cette problématique. Nous avons évalué ici la réponse au traitement de l'hémorragie intracérébrale en fonction du délai entre le trauma et l'administration de la première dose de dexaméthasone. Nous avons choisi d'aborder la question par les aspects cliniques, pharmacologiques et histopathologiques. La fonctionnalité motrice du système nerveux central, l'ampleur de l'infiltration neutrophilique et de la dégénérescence neuronale de même que le volume total occupé par l'hémorragie et la réaction des cellules astrocytaires ont tous été évalués dans notre étude.

## **2. Évaluation fonctionnelle**

Afin d'évaluer la fonctionnalité motrice du système nerveux central, nous avons sélectionné plusieurs tests ayant déjà prouvé qu'ils étaient adéquats pour démontrer le déficit secondaire à une lésion au niveau des noyaux de la base (Lema PP, 2004; Lema PP, 2005; Vachon P, 2003). Il s'agit d'un examen neurologique composé majoritairement de tests semi-quantitatifs et d'une épreuve quantitative de la coordination motrice évaluée à l'aide du rotarod.

Le noyau caudoputamen fait partie des noyaux gris de la base, reçoit son influx du cortex cérébral et fait des projections vers le thalamus et le tronc cérébral. Il est impliqué dans la coordination motrice et l'initiation du

mouvement (Jolicoeur FB, 1992; Kandel ER, 2000). Une lésion hémorragique unilatérale au niveau de ce noyau entraîne des signes cliniques facilement visualisables avec notre ensemble de tests soit une rigidité musculaire, un tremblement et une akinésie unilatérale associée à un défaut d'initiation du mouvement se démontrant par un tournis unilatéral et des anomalies de posture.

Suite à l'injection de collagénase, les performances des animaux ont chuté de façon notable. Les lésions induites au cerveau selon le modèle que nous avons utilisé s'établissent graduellement dans les heures qui suivent l'injection de collagénase pour culminer à 48 heures après l'injection (Rosenberg GA, 1990; Del Bigio MR, 1996; Chesney JA, 1995). Cette fenêtre de temps correspond également au moment où les déficits cliniques des animaux sont les plus sérieux. Par conséquent, il est primordial d'administrer le traitement à l'intérieur de cette fenêtre de temps afin de limiter la propagation des lésions et des problèmes secondaires relatifs à l'hémorragie cérébrale (œdème, hypoxie, ischémie, augmentation de la pression intracrânienne). La dexaméthasone administrée 2h post-injection de collagénase s'est avérée efficace pour améliorer la performance neurologique des animaux lors des tests neurologiques et du rotarod d'abord à 24h post-op puis de façon encore plus marquée 48h post-op. Les animaux traités à 4h et 6h post-op n'ont pas montré de résultats significativement supérieurs aux animaux contrôles. Ceci nous porte à croire que le traitement à la dexaméthasone n'a des effets bénéfiques que s'il est administré dans les 2 premières heures suivant le trauma cérébral.

### 3. Évaluation histopathologique et immunohistochimique

Dans les premières minutes suivant l'induction de l'hémorragie intracérébrale, une réaction inflammatoire s'installe (Rosenberg GA, 1990). Les neutrophiles renferment de nombreuses enzymes protéolytiques et cytokines capables d'amener la dégénérescence et la mort des cellules environnantes et du tissu conjonctif. De plus, certaines de ces substances sont capables de stimuler le recrutement de leucocytes au site de l'hémorragie (Kumar V, 2005 Chap 2; McGavin MD, 2007 Chap 3). Le relâchement de ces enzymes, cytokines et facteurs de transcription survient généralement lors de la défense de l'hôte face à un agresseur microbien mais a aussi été décrit lors de certains dommages cérébraux (Matsuo Y, 1994). Le dénombrement des neutrophiles au sein du foyer hémorragique fut donc utilisé pour quantifier la réaction inflammatoire aiguë lors d'hémorragie cérébrale. La dexaméthasone administrée 2, 4 ou 6 heures après la chirurgie s'est avérée efficace pour limiter le nombre de neutrophiles présents au sein de l'hématome. Le nombre le plus faible de neutrophiles étant associé au groupe ayant reçu le traitement dans les 2 premières heures post-opératoires. Ces résultats sont attribuables aux propriétés anti-inflammatoires des corticostéroïdes, et suggèrent que l'administration de dexaméthasone suite à un trauma cérébral aurait la capacité de limiter l'aggravation des lésions par la réaction inflammatoire aiguë.

Le nombre de neurones nécrotiques présents dans la pénombre entourant l'hématome n'a pas montré de changement significatif chez aucun des groupes par rapport au groupe contrôle. Ceci pourrait suggérer que le traitement



administré aurait de la difficulté à démontrer ses propriétés protectrices sur le parenchyme à la limite de l'hémorragie. Par contre, la dexaméthasone administrée à 2h, 4h et 6h post-op s'est avérée efficace pour réduire le volume de l'hématome. Par conséquent, une moins grande portion du neuropile est affectée chez ces animaux ce qui se traduit par une augmentation du nombre absolu de neurones viables. Ces résultats suggèrent donc que la dexaméthasone s'avère efficace pour limiter l'étendue de l'hémorragie et préserver plus de neurones fonctionnels.

Le système nerveux central répond à de nombreux événements nocifs par une activation des astrocytes (Summers BA, 1995). On pouvait donc s'attendre à une réaction astrocytaire secondaire à l'hémorragie intracérébrale. Ces cellules ont plusieurs rôles dans la guérison de dommages cérébraux et dans la protection neuronale. Comme prévu, les astrocytes démontrent une hyperplasie et une hypertrophie marquées chez tous les animaux, traités ou non. L'hypertrophie se démontre principalement par un corps cellulaire de grande taille, gonflé par un cytoplasme plus abondant, et l'appréciation de longues projections cytoplasmiques visibles grâce à la technique d'immunohistochimie GFAP (glial fibrillary acidic protein). Aussi, de l'œdème, de la fibrine et des lésions de vasculites nécrotiques sont notés à l'intérieur et au pourtour du foyer atteint. Tous ces changements ont pu être observés chez tous les groupes d'animaux, traités ou non. Ceci nous démontre que le modèle d'hémorragie intracérébrale induite par l'injection de collagénase est fidèlement représentatif des lésions survenant lors de différents traumatismes crâniens.

## **CONCLUSION**

En conclusion, la dexaméthasone a montré des effets bénéfiques pour le traitement de l'hémorragie cérébrale. Les effets ont par contre varié en fonction du délai accordé avant l'administration du traitement. La réduction du volume de la lésion et du nombre de neutrophiles dans la pénombre s'est exprimée chez les animaux traités à 2, 4 et 6 heures post-injection de collagénase. Seuls les animaux traités 2 heures suite à l'induction de l'hémorragie cérébrale ont démontré une amélioration significative de leur performance à l'examen neurologique. Ceci suggère que l'administration de dexaméthasone serait efficace dans le traitement de l'hémorragie cérébrale, particulièrement si administrée dans les 2 premières heures suivant le trauma crânien, ce qui est confirmé par les résultats de Lema et al. (Lema PP, 2004).

Ces résultats pourraient être extrapolés chez d'autres espèces animales, comme entre autres le chien, le chat, le cheval ou même les oiseaux, mais des recherches supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer le dosage de dexaméthasone à administrer chez chaque espèce. Une étude pharmacocinétique chez le rat serait intéressante afin de déterminer la concentration plasmatique de dexaméthasone afin d'établir une concentration plasmatique cible pour le traitement des autres espèces. Aussi, il serait intéressant de déterminer le moment charnière au-delà duquel la dexaméthasone n'exerce plus d'effet significatif. Par contre, en prévention lors de chirurgies cérébrales, nous envisageons que la dexaméthasone aurait une utilité pour la récupération post-opératoire.

## **SOURCES DOCUMENTAIRES**

- **Braakman, R, Schouten HJ, Blaauw-van Dishoeck M, Minderhoud JM,** Megadose steroids in severe head injury. Results of a prospective double-blind clinical trial. *J Neurosurg*, 1983; **58**(3): p.326-30.
- **Charriaut-Marlangue C,** Apoptosis: a target for neuroprotection. *Therapie*, 2004; **59**(2): p. 185-90
- **Chesney JA, Kondoh T, Conrad JA, Low WC,** Collagenase-induced intrastriatal hemorrhage in rats results in long-term locomotor deficits. *Stroke*, 1995; **26**(2): p.312-6.
- **Compton JS, Lee T, Jones NR et al.,** A double-blinded placebo controlled trial of the calcium entry blocking drugs, nicardipine, in the treatment of vasospasm following severe head injury. *Br J Neurosurg* 1990; **4**: 9-16.
- **Del Bigio MR, Yan HJ, Buist R, Peeling J,** Experimental intracerebral hemorrhage in rats. Magnetic resonance imaging and histopathological correlates. *Stroke*, 1996; **27**(12): p. 2312-9
- **Emerson TE, Raymond RM,** Methylprednisolone in the prevention of cerebral hemodynamic and metabolic disorders during endotoxin shock in the dog. *Surg Gynecol Obstet*, 1979; **148**(3): p. 361-6.
- **Finnie JW, Blumbergs PC,** Traumatic brain injury. *Vet Pathol*, 2002; **39**(6): p. 679-89.

- **Foda MA, Marmarou A**, A new animal model of diffuse brain injury in rats. Part II. Morphological characterization. *J Neurosurg*. 1994; **80**: 301-313
- **Gennarelli TA**, Head injury in man and experimental animals: clinical aspects. *Acta Neurochirurg*. 1983; **32** (suppl): 1-13
- **Graham DI, Raghupathi R, Saatman KE, Meaney DF, McIntosh TK**, Tissue tears in the white matter after lateral fluid percussion brain injury in the rat: relevance to human brain injury. *Acta Neuropathol* 2000; **99**(2): 117-24.
- **Hall ED**, High-dose glucocorticoid treatment improves neurological recovery in head-injured mice. *J Neurosurg*, 1985; **62**(6): p. 882-7
- **Hall ED**, Neuroprotective actions of glucocorticoid and non glucocorticoid steroids in acute neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol*, 1993. **13**(4): p. 415-32.
- **Hall ED, Braugher JM**, Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 1989. **6**(3): p. 303-13
- **Hara H**, Involvement of caspase on apoptosis in ischemia-induced neuronal death: usefulness of caspase inhibitors for stroke therapy. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 1999; **113**(2): p. 97-111

- **Hatton J**, Pharmacological treatment of traumatic brain injury: a review of agents in development. *CNS Drugs*, 2001. **15**(7): p. 553-81.
- **Irwin S**, Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioural and physiologic state of the mouse. *Psychopharm* 1968; **13**: 222-257.
- **Jolicoeur FB, Rivest R**, Rodent models of Parkinson's disease, *Neuromethods* 1992, **21**: 135-58.
- **Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM**, Principles of Neural Science, 4<sup>th</sup> ed, McGraw-Hill Medical, 2000, p. 853-871
- **Kumar V, Abbas AK, Fausto N**, Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2005, Chap 1,2, 28, 1525p.
- **Lau A., Arundine M, Sun HS, Jones M, Tymianski M**, Inhibition of caspase-mediated apoptosis by peroxynitrite in traumatic brain injury. *J Neurosci*, 2006, **26**(45): 11540-53.
- **Laurer HL, McIntosh TK**, Experimental models of brain trauma. *Curr Opin Neurol* 1999; **12**(6): 715-21.
- **Lebesgue D, LeBold DG, Surles NO, Morales DM, Etgen AM, Zukin RS, Saatman KE**, Effets of estradiol on cognition and hippocampal pathology after lateral fluid percussion brain injury in female rats. *J Neurotrauma* 2006, **23**(12): 216-25.

- **Lema PP, Girard C, Vachon P**, Evaluation of dexamethasone for the treatment of intracerebral hemorrhage using a collagenase-induced intracerebral hematoma model in rats. *J Vet Pharmacol Ther*, 2004. **27**(5): p. 321-8.
- **Lema PP, Girard C, Vachon P**, High doses of methylprednisolone are required for the treatment of collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Can J Vet Res*, 2005. **69**(4): p. 253-9.
- **Lighthall JW, Dixon CE, Anderson TE**, Experimental models of brain injury. *J Neurotrauma* 1989; **6**:83-97.
- **Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K**, Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke*, 1994; **25**(7): p. 1469-75
- **Matsuo Y, Onodera H, shiga Y, Shozuhara H, Ninomiya M, Kihara T, Timatani T, Miyasaka M, Kogure K**, Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain res*, 1994; **656**(2): p. 344-52
- **McGavin MD, Zachary JF**, Pathologic Basis of Veterinary Disease, 4<sup>th</sup> ed., Mosby Elsevier, St. Louis, c2007, Chap 1, 3, 14, 1476p
- **Montgomery DL**, Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol*, 1994; **31**(2): p. 145-67



- **Mun-Bryce S, Rosenberg GA**, Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998; **18**(11): p. 1163-72
- **Nath FP, Kelly PT, Jenkins A, Mendelow AD, Graham DI, Teasdale GM**, Effects of experimental intracerebral hemorrhage on blood flow, capillary permeability, and histochemistry, *J Neurosurg*, 1987; **66**(4): p. 555-62
- **Nelson LR, Auen EL, Bourke RS, Barron KD**, A new head injury model for evaluation of treatment modalities. *Neurosci Abst*; 1979; **5**: 516
- **Oliver JE, Lorenz MD**, Handbook of veterinary neurology. Saunders W.B., Philadelphia, 1993: p. 26-29
- **Paxinos G, Watson C**, The rat brain in stereotaxic coordinates. 4<sup>th</sup> ed. 1998, San Diego: Academic Press.
- **Peeling J, Yan HJ, Chen SG, Campbell M, Del Bigio MR**, Protective effects of free radical inhibitors in intracerebral hemorrhage in rat, *Brain Res* 1998; **795**(1-2): 63-70.
- **Platt SR, Garosi L**, Canine cerebrovascular disease: do dogs have strokes? *J Am Anim Hosp Assoc*, 2003. **39**(4): p. 337-42
- **Plesnila N, von Baumgarten L, Retiounskaia M, Engel D, Ardeshiri A, Zimmermann R, Hoffmann F, Landshamer S, Wagner E, Culmsee C**, Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent

inhibition of NF-kappaB transcriptional activity, *Cell Death Differ*, 2007; **14**(8): p.1529-41

- **Plumb DC**, Plumb's Veterinary Drug Handbook, 5<sup>th</sup> ed, Blackwell Publishing, Ames, 2005: 297-301.
- **Regan RF, Guo Y**, Toxic effect of haemoglobin on spinal cord neurons in culture. *J Neurotrauma*, 1998; **15**(8): p. 645-53.
- **Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB**, Neuroprotection by the inhibition of apoptosis, *Brain Pathol*, 2000; **10**(2): p. 283-92
- **Robson D**, Review of the pharmacokinetics, interactions and adverse reactions of cyclosporine in people, dogs and cats, *Vet Rec*, 2003; **152**(24): p.739-48
- **Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M**, Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*, 1990; **21**(5): p. 801-7.
- **Ross DT, Meaney DF, Sabol M, Smith DH, Thibault LE, Gennarelli TA**, Distribution of diffuse axonal injury following inertial closed head injury in miniature swine. *Exp Neurol* 1994; **126**: p. 291-299
- **Shapira Y, Shohami E, Sid A**, Experimental closed head injury in rats: mechanical pathophysiologic and neurologic properties. *Crit Care Med* 1988; **16**: p.258-265
- **Slauson DO and Cooper BJ**, Mecanisms of disease: A textbook of comparative general pathology, 3<sup>rd</sup> ed, Mosby, 2001, p.140-245.

- **Summers BA, Cummings JF**, Veterinary Neuropathology, Mosby, Ithaca, 1995: p.1-55.
- **Tornheim PA, Linwnicz DH, Hirsch CS, Brown DL, McLaurin RL**, Acute responses to blunt head trauma. Experimental model and gross pathology. *J Neurosurg* 1983; **59**: 431-438
- **Vachon P, Ste-Marie L, Montgomery J**, Utilisation de tests comportementaux pour prédire l'étendue de l'ischémie cérébrale induite par la cauterisation de l'artère cérébrale moyenne. *Sci Tech Anim Lab* 1999 ; **24** : 171-177.
- **Vachon P, Beaudry F, Marier JF, Ste-Marie L, Montgomery J**, Cyclosporin A in blood and brain tissue following intra-carotid injections in normal and stroke-induced rats. *Brain Res*, 2002. **943**(1): p. 1-8
- **Vachon P, Moreau JP**, Low doses of dexamethasone decrease brain water content of collagenase-induced cerebral hematoma. *Can J Vet Res*, 2003. **67**(2): p. 157-9.
- **Wang KK, Larner SF, Robinson G, Hayes RL**, Neuroprotection targets after traumatic brain injury, *Curr Opin Neurol* 2006; **19**(6): 514-9.
- **Wei G, Wang D, Lu H, Parmentier S, Wang Q, Panter SS, Frey WH 2<sup>nd</sup>, Ying W**, Intranasal administration of a PARG inhibitor profoundly decreases ischemic brain injury, *Front Biosci*, 2007; **1**(12): p. 4986-96

- **Whiting MD, Hamm RJ**, Traumatic brain injury produces delay-dependent memory impairment in rats. *J Neurotrauma*, 2006, **23**(10): 1529-34.

## **ANNEXES**

**ANNEXE I - RÉPARTITION DES ANIMAUX PAR GROUPE****Tableau I****Répartition des rats par groupes**

	Contrôle	2h	4h	6h
Nombre d'animaux	6	9	7	7

## ANNEXE II - PHOTOGRAPHIES MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure 1

### Photographie du matériel utilisé lors de la chirurgie



(photo : Pascal Vachon, 2006)

#### Légende :

- A** : cage d'induction
- B** : Isoflurane
- C** : stéréomicroscope
- D** : appareil stéréotaxique
- E** : emplacement de l'animal

Figure 2. Photographie de la technique chirurgicale



(photo : Pascal Vachon, 2006)

Légende :

**A :** seringue Hamilton fixée à l'appareil stéréotaxique

**B :** entrée/retour du gaz anesthésique

**C :** écarteur à tissus



# ANNEXE III - TABLES DE RÉSULTATS

**Tableau II**

## Performances sur Rotarod des animaux 24h post-op

(valeurs exprimées en % de leur performance pré-op)

Rotarod - 24h post-op			
contrôle positif	2h	4h	6h
6,3	57,6	21,9	39,1
1,3	88,2	39,8	29,0
1,3	45,5	18,6	45,0
2,0	57,6	52,7	16,1
47,5	71,0	25,7	6,4
2,2	48,3	9,3	5,8
	6,4	37,1	4,0
	8,4		

**Tableau III**

## Performances sur Rotarod des animaux 48h post-op

(valeurs exprimées en % de leur performance pré-op)

Rotarod - 48h post-op			
contrôle positif	2h	4h	6h
9,2	57,2	5,2	11,5
4,0	72,6	5,7	32,1
6,9	78,0	4,0	17,3
4,1	66,3	70,5	24,2
25,7	100,0	97,7	5,4
65,6	100,0	16,9	35,4
	36,1	34,7	4,2
	8,0		

**Tableau IV****Performances à l'examen neurologique des animaux 24h post-op**

(valeurs exprimées en % de leur performance pré-op)

neurological exam - 24h post-op			
contrôle positif*	2h*	4h	6h
55,0	95,0	45,0	55,0
45,0	-	70,0	80,0
45,0	70,0	45,0	75,0
50,0	45,0	70,0	55,0
-	85,0	60,0	50,0
45,0	75,0	50,0	55,0
	50,0	60,0	55,0
	90,0		

\*dans ces groupes un animal n'a pu faire l'examen neurologique parce que apeuré

**Tableau V****Performances à l'examen neurologique des animaux 24h post-op**

(valeurs exprimées en % de leur performance pré-op)

neurological exam - 48h post-op			
contrôle positif	2h	4h	6h
50,0	100,0	55,0	40,0
40,0	100,0	55,0	60,0
35,0	95,0	45,0	70,0
50,0	45,0	85,0	65,0
70,0	95,0	55,0	45,0
60,0	100,0	50,0	60,0
	65,0	60,0	65,0
	75,0		

Tableau VI

**Nombre de neurones nécrotiques par animal par groupe**

neurones nécrotiques			
contrôle positif	2h*	4h	6h
187	122	226	521
251	119	46	378
157	116	283	290
200	214	149	125
261	133	190	235
281	121	359	281
	211	280	253
	-		

\*pour un animal, le bloc a brisé à l'histologie. Les lames produites ne présentaient pas suffisamment de tissus cérébral autour de l'hématome pour un calcul adéquat du nombre de neurones nécrotiques.

Tableau VII

**Nombre de neutrophiles par animal par groupe**

neutrophiles			
contrôle positif	2h	4h	6h
1509	535	1049	1168
1800	651	745	1161
1604	813	344	876
1345	1461	900	681
2055	526	829	1403
1173	502	853	1259
	546	1462	1131
	602		

Tableau VIII

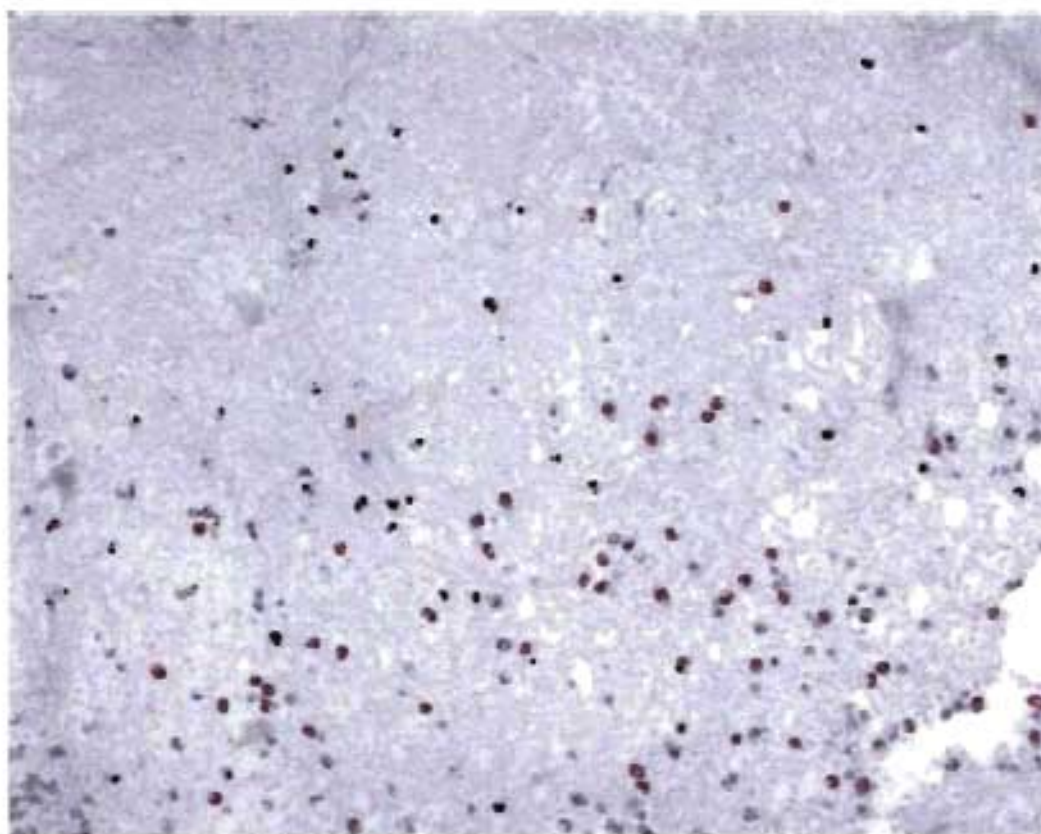
Volume de l'hématome intracérébral par animal par groupe

volume - mm <sup>3</sup>			
contrôle positif	2h	4h	6h
29,7	5,1	31,6	21,5
30,8	4,3	17,0	23,0
25,9	20,9	11,8	17,9
34,6	18,8	11,6	16,8
24,1	20,9	16,9	11,1
13,1	5,9	16,0	14,1
	9,3	11,4	12,6
	14,9		

#### ANNEXE IV - MICROPHOTOGRAPHIES DES PARAMÈTRES ÉVALUÉS

Figure 1.

Microphotographie à 20X des neutrophiles présents dans la pénombre

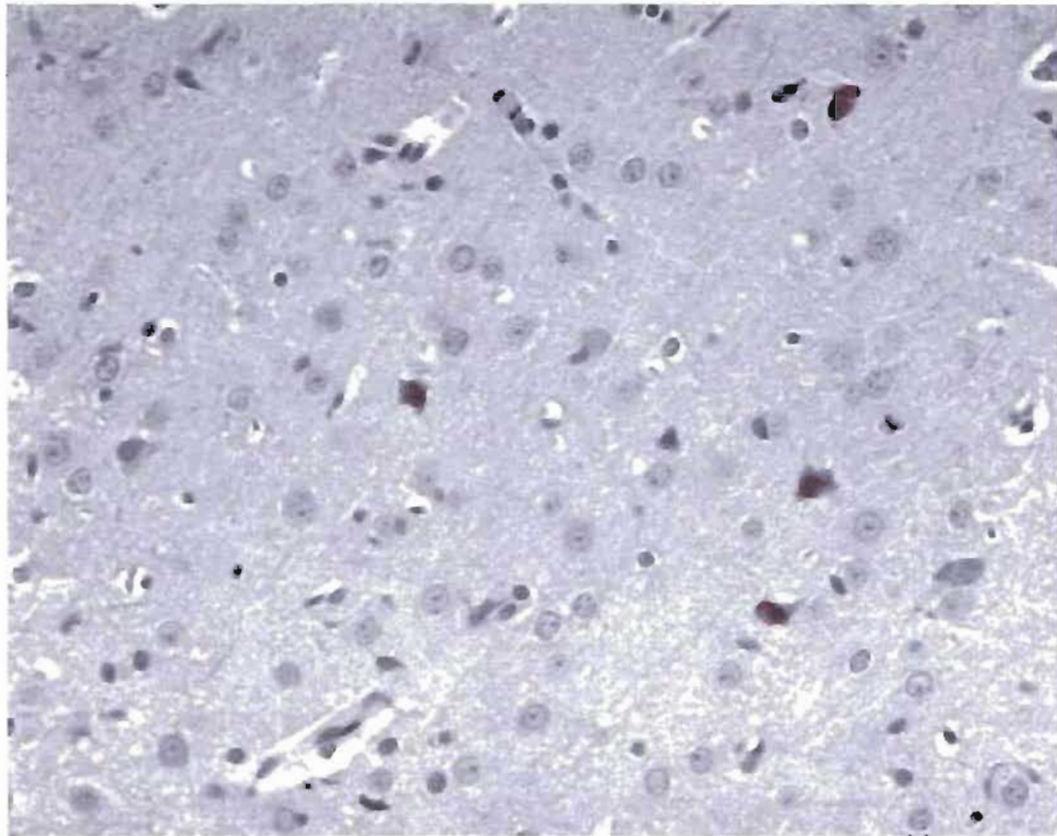


**En rouge:** neutrophiles

(Photo: Claudine Savard, 2007)

Figure 2.

Microphotographie à 20X des neurones nécrotiques

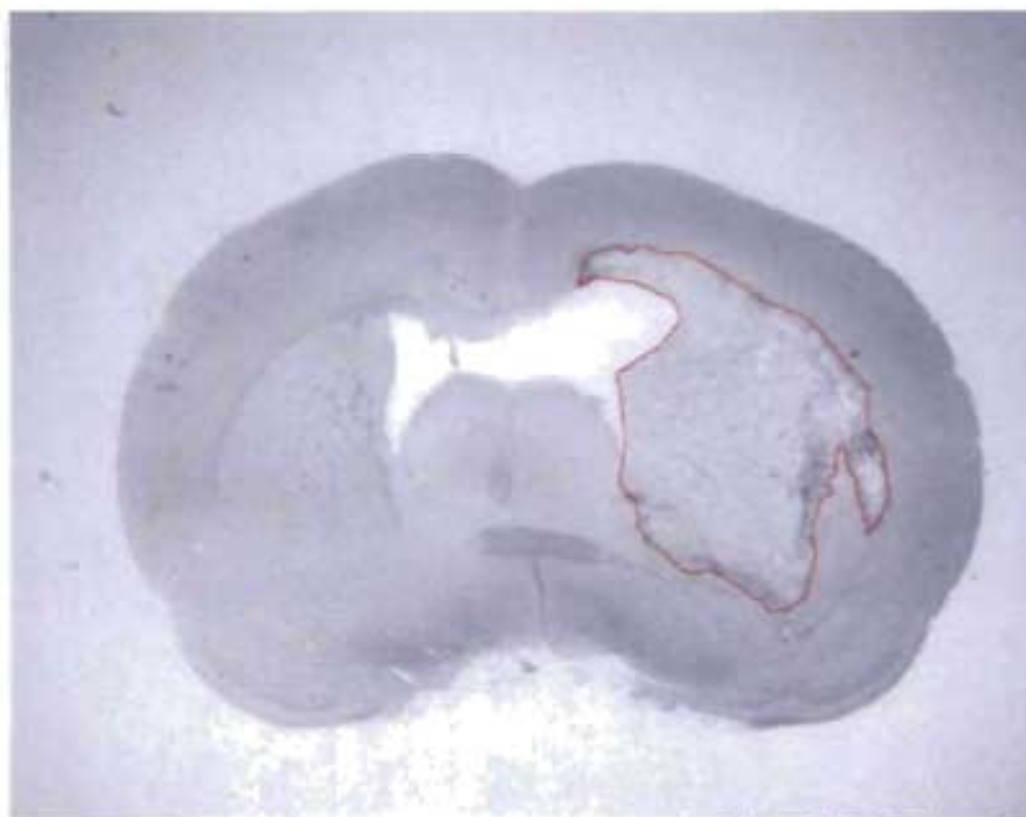


**En rouge:** neurones nécrotiques

(Photo : Claudine Savard, 2007)

Figure 3.

Photographie au stéréomicroscope de l'hémorragie intracérébrale



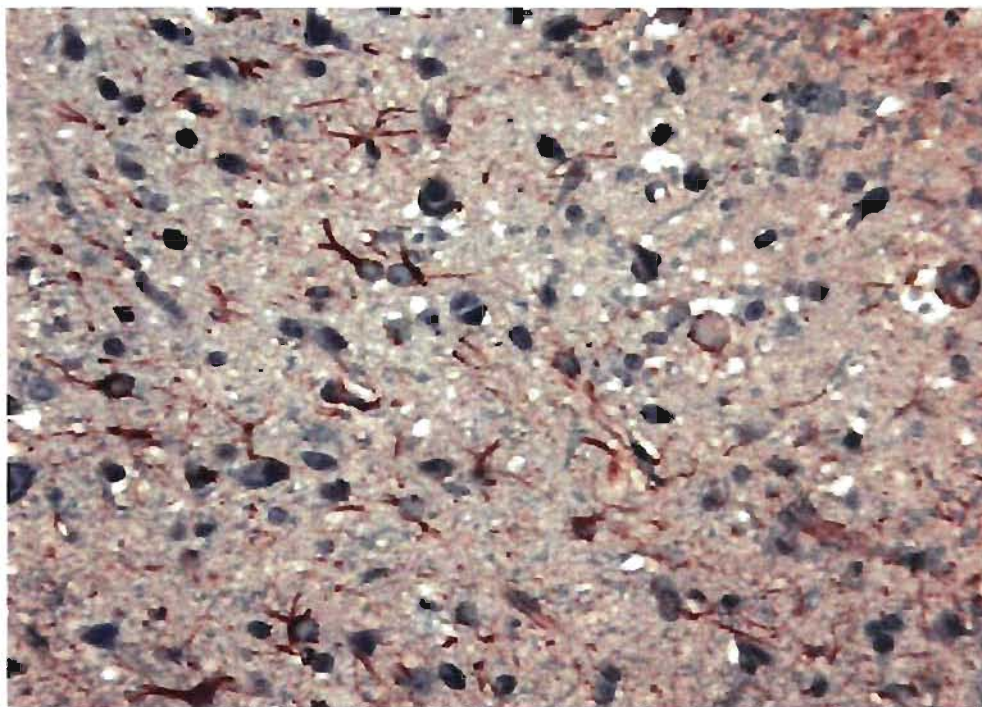
(Photo: Claudine Savard, 2007)

**En rouge:** limite de l'hématome tel que déterminé pour le calcul du volume



Figure 4.

Microphotographie à 20X des astrocytes réactifs



(Photo : Claudine Savard, 2007)

**En brun : projections cytoplasmiques des astrocytes réactifs**